



(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008129111/10, 15.12.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.12.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
16.12.2005 US 60/751,377

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2010 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 20.08.2011 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 03/059245 A, 24.07.2003. WO 01/94586
A, 13.12.2001. EA 6108 B1, 25.08.2005. WANG
et al., "Characterization and functional study of
five novel monoclonal antibodies against human
OX40L highlight reverse signalling: enhancement
of IgG production of B cells and promotion of
maturation of DCs", Tissue Antigens 2004, Vol.64,
no. 5, реферат.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.07.2008(86) Заявка РСТ:
US 2006/062173 (15.12.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/133290 (22.11.2007)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спаская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

МАРТИН Флейвиус (US)

(73) Патентообладатель(и):

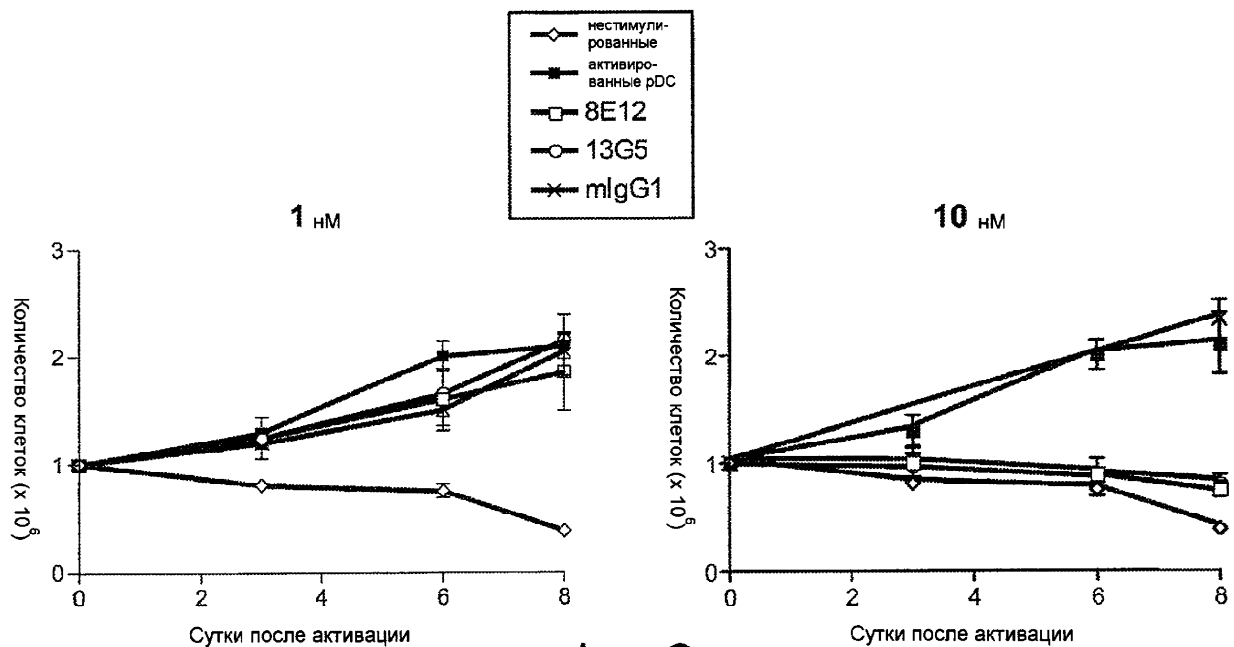
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) АНТИТЕЛА К OX40L И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к
иммунологии и биотехнологии. Предложено
антитело, специфичное к OX40L человека,
содержащее легкую цепь и тяжелую цепь,
каждая из которых содержит соответственно
три CDR легкой и три CDR тяжелой цепи.
Описаны: кодирующий полинуклеотид, а

также вектор экспрессии, клетка-хозяин,
включающие кодирующий полинуклеотид.
Раскрыты: способ получения и способ лечения
с использованием антитела. Использование
изобретения может найти дальнейшее
применение в терапии иммунных расстройств,
опосредованных OX40L. 6 н. и 22 з.п. ф-лы, 8
ил., 1 табл.



RU 2 4 2 6 7 4 4 C 2

RU 2 4 2 6 7 4 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 15/63** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 37/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2008129111/10, 15.12.2006**(24) Effective date for property rights:
15.12.2006

Priority:

(30) Priority:

16.12.2005 US 60/751,377(43) Application published: **27.01.2010 Bull. 3**(45) Date of publication: **20.08.2011 Bull. 23**(85) Commencement of national phase: **16.07.2008**

(86) PCT application:

US 2006/062173 (15.12.2006)

(87) PCT publication:

WO 2007/133290 (22.11.2007)

Mail address:

129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):

MARTIN Flejvius (US)

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)**(54) OX40L ANTIBODIES AND METHODS FOR USING**

(57) Abstract:

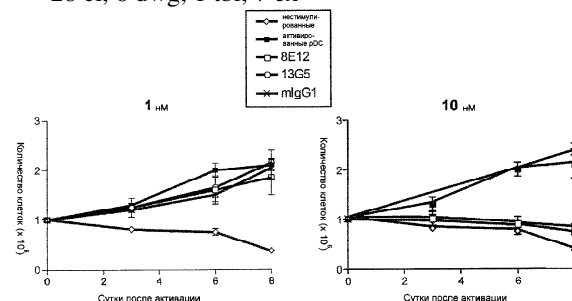
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is offered is a human OX40L antibody containing a light chain and a heavy chain each of which contains respectively three CDRs of the light chain and three CDRs of the heavy chain. There are described: a coding polynucleotide, and also an expression vector and a host cell including coding polynucleotide. There are disclosed: a method of producing and a method of treating with using the antibody.

EFFECT: use of the invention can find further

application in therapy of the OX40L mediated immune disorders.

28 cl, 8 dwg, 1 tbl, 7 ex



Фиг.6

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет в 35 USC § 119 для предварительной заявки США № 60/751377, зарегистрированной 16 декабря 2005, полное содержание которой приведено здесь в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в основном относится к областям молекулярной биологии. Более конкретно, изобретение относится к антителам к OX40L и их применениям.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лиганд OX40 человека (OX40L), мембраносвязанный представитель суперсемейства фактора некроза опухолей, преимущественно экспрессируется на активированных антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки, и в меньшей степени В-клетках. Смотри Sugamura, K et al., *Nature Reviews Immunology* 4:420 (2004); Weinberg AD, *Trends Immunol.* 23(2):102 (2002). OX40L, также известный как рецептор АСТ-4, TNF4 человека, GP34 и CD134L, связывается с рецептором OX40 (OX40), который также называется CD134, АСТ-4, антиген CD134, антиген АСТ35 и TNFR4 человека. OX40 является белком активации Т-клеток, который экспрессируется вслед за связыванием Т-клеточного рецептора (TCR). Связывание CD40 активированными антигенпрезентирующими клетками повышает экспрессию OX40L. Связывание OX40 посредством OX40L является костимулирующим для эффекторных Т-клеток, и костимуляция активирует выработку цитокинов клетками Т-хелперами 1 и Т-хелперами 2. Взаимодействия OX40-OX40L также важны для образования Т-клеток памяти, они содействуют выживанию эффекторных Т-клеток после примирования антигена. Блокирование OX40L *in vivo* снижало тяжесть ревматоидного артрита, экспериментального аутоиммунного заболевания (ЕАЕ), острого заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD), воспалительного заболевания кишечника, экспериментального лейшманиоза и индуцированного коллагеном артрита у модельных животных. Смотри Sugamura, K et al., *Nature Reviews Immunology* 4:420 (2004); Weinberg AD, *Trends Immunol.* 23(2):102 (2002).

Анти-OX40L и антитела, распознающие OX40L, упомянуты, например, в WO 95/12673; WO 95/21915; WO 99/15200; Baum, P.R., et al., *EMBO J.* 13 (1994) 3992-4001; Imura, A., et al., *Blood* 89 (1997) 2951-2958; Imura, A., et al., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2185-2195; Kjaergaard, J., et al., *J. Immunol.* 167 (2001) 6669-6677; Lane, P., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 201-206; Mallett, S., and Barclay, A.N., *Immunol. Today* 12 (1991) 220-223; Mallett, S., et al., *EMBO J.* 9 (1990) 1063-1068; Ndhlovu, L.C., et al., *J. Immunol.* 167 (2001) 2991-2999; Oyshima, Y., et al., *J. Immunol.* 159 (1997) 3838-3848; Rogers, P.R., et al., *Immunity* 15 (2001) 445-455; Stüber, E., and Strober, W., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 979-989; Stüber, E., et al., *Gastroenterology* 115 (1998) 1205-1215; Takahashi, &, et al., *J. Virol.* 75 (2001) 6748-6757; Takasawa, N., et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (2001) 377-382; Taylor, L., and Schwarz, H., *J. Immunol. Meth.* 255 (2001) 67-72; Weinberg, A.D., et al., *Nature Medicine* 2 (1996) 183-189; Weinberg, A.D., et al., *Semin. Immunol.* 10 (1998) 471-480; Weinberg, A.D., *Trends Immunol.* 23 (2002) 102-109; Wu, T., et al., *Transplant. Proc.* 33 (2001) 217-218; Higgins, L.M., et al., *J. Immunol.* 162 (1999) 486-493; Yoshioka, T., et al., *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 2815-2823; и Wang, Q., et al. *Tissue Antigens* 64:566-574 (2004). Мышиные антитела к OX40L человека коммерчески доступны от MBL International Corp. (TAG-34) и R and D Corp (клоны 159403 и 159408).

Ясно, что сохраняется потребность в средствах, которые обладают клиническими характеристиками, которые оптимальны для разработки этих средств в качестве терапевтических средств. Описанное здесь изобретение отвечает этой потребности и

обладает другими преимуществами.

Все цитированные здесь ссылки, включая патентные заявки и публикации, приведены в качестве ссылки в полном объеме.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение частично основано на идентификации множества веществ, связывающихся с OX40L (таких как антитела и их фрагменты). OX40L представляет собой важную и предпочтительную мишень для терапии, и изобретение относится к композициям и способам на основе связывания OX40L. Вещества по изобретению, связывающиеся с OX40L, как описано в данном описании, являются важными терапевтическими и диагностическими средствами для применения при воздействии на патологические состояния, связанные с экспрессией и/или активностью путей с участием OX40L-рецептора OX40. Таким образом, изобретение относится к способам, композициям, наборам и изделиям, относящимся к связыванию OX40L.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу к OX40L, где полноразмерная форма IgG антитела специфически связывается с OX40L человека с аффинностью связывания приблизительно 10 нМ или лучше. Как общепринято в данной области, аффинность связывания лиганда со своим рецептором можно определить с использованием любого из множества анализов и выразить в терминах множества количественных величин. Таким образом, в одном из вариантов осуществления аффинность связывания выражается как величины Kd и отражает собственную аффинность связывания (например, с минимизированными эффектами avidности). Как правило, и предпочтительно, аффинность связывания измеряют *in vitro*, или в бесклеточной, или связанной с клетками системе. Любое количество анализов, известных в данной области, включая анализы, описанные здесь, можно применять для получения измерений аффинности связывания, включая, например, Biacore, радиоиммунный анализ (RIA) и ELISA.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с областью OX40L, связывающейся с рецептором OX40. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело связывается с полипептидом, содержащим внеклеточный домен OX40L человека или состоящим из него.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу к OX40L, которое конкурирует с рецептором OX40 за связывание с OX40L.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу к OX40L, которое ингибирует, снижает и/или блокирует активность OX40L.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, которое ингибирует, снижает и/или блокирует пролиферацию Т-клеток.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, которое ингибирует, снижает и/или блокирует выживаемость активированных Т-клеток.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, которое ингибирует, снижает и/или блокирует секрецию IL-2 Т-клетками памяти.

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, содержащему, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять и/или шесть последовательностей гипервариабельной области (HVR), выбранных из группы, состоящей из: RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1), RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2), RVSNRFS (SEQ ID NO:3), KVSNRFS (SEQ ID NO:4), FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5), SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6), SYWLN (SEQ ID NO:7), SYWMH (SEQ ID NO:8), MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9), EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10), GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11) и ERSPRYFDV (SEQ ID NO:12).

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, содержащему, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять и/или шесть последовательностей гипервариабельной области (HVR), выбранных из группы, состоящей из: (a) HVR-L1, содержащей последовательность RSSQSIVHGNNGNTYLE (SEQ ID NO:1)
 5 или RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2); (b) HVR-L2, содержащей последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO:3) или KVSNRFS (SEQ ID NO:4); (c) HVR-L3, содержащей последовательность FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5) или SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6); (d) HVR-H1, содержащей последовательность SYWLN (SEQ ID NO:7)
 10 или SYWMH (SEQ ID NO:8); (e) HVR-H2, содержащей последовательность MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9) или EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10); и (f) HVR-H3, содержащей последовательность GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11) или ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12).

15 В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:
 DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNNGNTYLEWHLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGS
 TDFTLKINRVEAEDLGVIYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:13) или
 20 DIVMTQTPLSLPVSLGDQASMYCRSSQSPVHSNGNTYLHWYLNQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS
 GTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:14);

и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:
 QVQLQQPGAELVRPGASVLSCKASGYTFTSYWLNWVKQRPGQGLEWIVMIDPSDSETHYNQVFKDKATL
 TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCIRGRGNFYGGSHAMEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 15) или
 25 QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYSTSYWMHGVQRPGQGLEWIGEDPSNGRTNYNEKFKSKATL
 TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRERSPTYFDVWGAGTLLTVSS (SEQ ID NO:16).

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, содержащему, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять и/или шесть последовательностей гипервариабельной области (HVR), выбранных из группы, состоящей из: (a) HVR-L1, содержащей последовательность RSSQSIVHGNNGNTYLE (SEQ ID NO:1), или HVR-L1, содержащей последовательность RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2); (b) HVR-L2, содержащей последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO:3), или HVR-L2, содержащей последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO:4); (c) HVR-L3, содержащей последовательность FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5), или HVR-L3, содержащей последовательность SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6); (d) HVR-H1, содержащей последовательность SYWLN (SEQ ID NO:7), или HVR-H1, содержащей последовательность SYWMH (SEQ ID NO:8); (e) HVR-H2, содержащей последовательность MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9), или HVR-H2, содержащей последовательность EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10); и (f) HVR-H3, содержащей последовательность GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11), или HVR-H3, содержащей последовательность ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12).

45 В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, содержащему, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять и/или шесть последовательностей гипервариабельной области (HVR), выбранных из группы, состоящей из: (a) HVR-L1, содержащей последовательность RSSQSIVHGNNGNTYLE (SEQ ID NO:1); (b) HVR-L2, содержащей последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO:3); (c) HVR-L3, содержащей последовательность FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5); (d) HVR-H1, содержащей последовательность SYWLN (SEQ ID NO:7); (e) HVR-H2, содержащей последовательность MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9); и (f) HVR-H3, содержащей последовательность GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит легкую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1), RVSNRFS (SEQ ID NO:3) и FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5). В одном из вариантов осуществления антитела содержат легкую цепь HVR-L1, обладающую аминокислотной последовательностью RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1). В одном из вариантов осуществления антитело содержит легкую цепь HVR-L2, обладающую аминокислотной последовательностью RVSNRFS (SEQ ID NO:3). В одном из вариантов осуществления антитело содержит легкую цепь HVR-L3, обладающую аминокислотной последовательностью FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5). В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из SYWLN (SEQ ID NO:7), MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9) и GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H1, обладающую аминокислотной последовательностью SYWLN (SEQ ID NO:7). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H2, обладающую аминокислотной последовательностью MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H3, обладающую аминокислотной последовательностью GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11). В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из SYWLN (SEQ ID NO:7), MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9) и GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11), и легкую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1), RVSNRFS (SEQ ID NO:3) и FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью: DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNTYLEWHLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKINRVEAEDLGYYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:13).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью: QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWLNWVKQRPGQGLEWIVMIDPSDSETHYNQVFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCIRGRGNFYGGSHAMEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 15).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью: DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNTYLEWHLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSG TDFTLKINRVEAEDLGYYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:13);

и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью: QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWLNWVKQRPGQGLEWIVMIDPSDSETHYNQVFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCIRGRGNFYGGSHAMEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 15).

В одном из аспектов изобретение относится к антителу к OX40L, содержащему, по меньшей мере, одну, две, три, четыре, пять и/или шесть последовательностей гипервариабельной области (HVR), выбранных из группы, состоящей из: (a) HVR-L1, содержащей последовательность RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2); (b) HVR-L2, содержащей последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO:4); (c) HVR-L3, содержащей последовательность SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6); (d) HVR-H1, содержащей

последовательность SYWMH (SEQ ID NO:8); (e) HVR-H2, содержащей последовательность EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10); и (f) HVR-H3, содержащей последовательность ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит легкую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2), KVSNRFS (SEQ ID NO:4) и SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6). В одном из вариантов осуществления антитело содержит легкую цепь HVR-L1, обладающую аминокислотной последовательностью RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2). В одном из вариантов осуществления антитело содержит легкую цепь HVR-L2, обладающую аминокислотной последовательностью KVSNRFS (SEQ ID NO:4). В одном из вариантов осуществления антитело содержит легкую цепь HVR-L3, обладающую аминокислотной последовательностью SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6). В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из SYWMH (SEQ ID NO:8), EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10) и ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H1, обладающую аминокислотной последовательностью SYWMH (SEQ ID NO:8). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H2, обладающую аминокислотной последовательностью EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10). В одном из вариантов осуществления антитело содержит тяжелую цепь HVR-H3, обладающую аминокислотной последовательностью ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12). В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из SYWMH (SEQ ID NO:8), EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10) и ERSPTYFDV (SEQ ID NO:12), и легкую цепь, содержащую, по меньшей мере, одну, по меньшей мере, две или все три последовательности HVR, выбранные из группы, состоящей из RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2), KVSNRFS (SEQ ID NO:4) и SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:
DIVMTQTPLSLPVSLGDQASMYCRSSQSPVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVDPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYSFTSYWMHGVRRPQGLEWIGEIDPSNGRTNYNEKFKSKATL
TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRERSPTYFDVWGAGTTLTVSS (SEQ ID NO:16).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:
DIVMTQTPLSLPVSLGDQASMYCRSSQSPVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVDPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:14);

и содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:
QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYSFTSYWMHGVRRPQGLEWIGEIDPSNGRTNYNEKFKSKATL
TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRERSPTYFDVWGAGTTLTVSS (SEQ ID NO:16).

Как известно в данной области и как описано с дополнительными подробностями ниже, положение аминокислот/определение границ гипервариабельной области антитела может варьироваться в зависимости от контекста, и в данной области

известны разные определения (как описано ниже). Некоторые положения внутри
 переменного домена можно рассматривать как гибридные гиперпеременные
 положения в том отношении, что эти положения можно считать расположенными
 внутри гиперпеременной области, исходя из одного набора критериев, в то время
 как их будут считать расположенными за пределами гиперпеременной области,
 исходя из другого набора критериев. Одно или несколько из этих положений можно
 также обнаружить в расширенных гиперпеременных областях (как далее
 определено ниже).

В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным
 антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является
 поликлональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело
 выбрано из группы, состоящей из химерного антитела, аффинно-зрелого антитела,
 гуманизированного антитела и человеческого антитела. В некоторых вариантах
 осуществления антитело является фрагментом антитела. В некоторых вариантах
 осуществления антитело является Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ или scFv.

В одном из вариантов осуществления антитело является химерным антителом,
 например антителом, содержащим антигенсвязывающие последовательности из не
 являющегося человеком донора, привитые на гетерологичную не принадлежащую
 человеку, человеческую или гуманизированную последовательность (например,
 последовательности каркасного и/или константного домена). В одном из вариантов
 осуществления не являющийся человеком донор является мышью. В одном из
 вариантов осуществления антигенсвязывающая последовательность является
 синтетической, например, получаемой мутагенезом (например, скринингом с
 помощью фагового дисплея и т.п.). В одном из вариантов осуществления химерное
 антитело по изобретению обладает мышинными V-областями и человеческой C-
 областью. В одном из вариантов осуществления мышинная V-область легкой цепи
 слита с человеческой легкой цепью каппа. В одном из вариантов осуществления
 мышинная V-область тяжелой цепи слита с человеческой C-областью IgG1.

Гуманизированные антитела по изобретению включают антитела, которые
 обладают аминокислотными заменами в FR и вариантами аффинного созревания с
 заменами в привитых CDR. Замещенные аминокислоты в CDR или FR не ограничены
 аминокислотами, присутствующими в антителах донора или реципиента. В других
 вариантах осуществления антитела по изобретению дополнительно содержат замены
 аминокислотных остатков в Fc-области, что приводит к улучшению эффекторной
 функции, включая усиление функции CDC и/или ADCC, и киллинга В-клеток. Другие
 антитела по изобретению включают антитела, обладающие специфическими
 заменами, которые улучшают стабильность. В других вариантах осуществления
 антитела по изобретению содержат замены аминокислотных остатков в Fc-области,
 что приводит к ослаблению эффекторной функции, например ослаблению
 функции CDC и/или ADCC и/или ослаблению киллинга В-клеток. В некоторых
 вариантах осуществления антитела по изобретению характеризуются снижением
 связывания (таким как отсутствие связывания) с фактором комплемента человека C1q
 и/или Fc-рецептором человека на естественных киллерных (NK) клетках. В некоторых
 вариантах осуществления антитела по изобретению характеризуются снижением
 связывания (таким как отсутствие связывания) с FcγRI, FcγRIIA и/или FcγRIIA
 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению
 принадлежат к классу IgG (например, IgG1 или IgG4) и содержат, по меньшей мере,
 одну мутацию в E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331

и/или P329 (нумерация согласно индексу EU). В некоторых вариантах осуществления антитела содержат мутацию L234A/L235A или D265A/N297A.

В одном из аспектов изобретение относится к полипептидам анти-OX40L, содержащим любую из представленных здесь антигенсвязывающих последовательностей, где полипептиды анти-OX40L специфически связываются с OX40L.

В одном из аспектов изобретение относится к иммуноконъюгату (взаимозаменяемо обозначенному как «конъюгат антител с лекарственным средством» или «ADC»), содержащему любое из описанных здесь антител к OX40L, конъюгированных с веществом, таким как лекарственное средство.

Антитела по изобретению связываются (в некоторых вариантах осуществления специфически связываются) с OX40L и, в некоторых вариантах осуществления, могут модулировать один или несколько аспектов эффектов, связанных с OX40L, включая в качестве неограничивающих примеров активацию OX40L, молекулярную передачу сигнала в направлении от OX40L, активацию рецептора OX40, молекулярную передачу сигнала в направлении от рецептора OX40, нарушение связывания рецептора OX40 с OX40L, мультимеризацию OX40L и/или нарушение любого биологически важного биологического пути с участием OX40L и/или рецептора OX40, и/или лечение, и/или профилактику иммунного расстройства (такого как астма, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, болезнь «трансплантат против хозяина» (GVHD) и/или системная красная волчанка); и/или лечение или профилактику расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью OX40L (такой как повышение экспрессии и/или активности OX40L). В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению специфически связывается с OX40L. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с областью связывания OX40L рецептора OX40. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело связывается с полипептидом, содержащим внеклеточный домен OX40L человека, состоящим из него или состоящим из него по существу. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с OX40L с Kd приблизительно 1 нМ или сильнее. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с OX40L с Kd приблизительно 10 нМ или сильнее. В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению снижает, ингибирует и/или блокирует активность OX40L *in vivo* и/или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления антитело конкурирует с OX40L за связывание с рецептором OX40 (снижает и/или блокирует связывание рецептора OX40 с OX40L).

В одном из аспектов изобретение относится к применению антитела по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство является аутоиммунным расстройством. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой заболевание, связанное с вирусом, бактериями или другим инфекционным агентом, например вызванную вирусом иммунопатологию, например патологию, вызванную инфекцией вирусами гриппа или RSV, или родственными вирусами, например, в легком. См. в основном US2005/0069548 A1. В некоторых вариантах

осуществления расстройство представляет собой артрит (острый и хронический ревматоидный артрит, включая ювенильный ревматоидный артрит и стадии, такие как ревматоидный синовит, подагра или подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, индуцированный коллагеном артрит II типа, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, вертебральный артрит, остеоартрит, хронический прогредиентный артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, менопаузальный артрит, артрит вследствие снижения выработки эстрогенов и анкилозирующий спондилит/ревматоидный спондилит), аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание, воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как бляшковый псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопию, включая атопические заболевания, такие как сенная лихорадка и синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, эксфолиативный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, сыпь, герпетический дерматит, монетовидный дерматит, себорейный дерматит, неспецифический дерматит, первичный раздражающий контактный дерматит и атопический дерматит, х-сцепленный гипер-IgM-синдром, аллергические внутриглазные воспалительные заболевания, крапивницу, такую как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, миозит, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (в том числе системную склеродермию), склероз, такой как системный склероз, рассеянный склероз (MS), такой как спинооптический MS, первично-прогрессирующий MS (PPMS) и рецидивирующий ремитирующий MS (RRMS), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, множественный склероз, атаксический склероз, оптический нейромиелит (NMO), воспалительное заболевание кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, опосредуемые иммунной системой заболевания желудочно-кишечного тракта, воспаление желудочно-кишечного тракта, колит, такой как язвенный колит, *colitis ulcerosa*, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), воспаление кишечника, гангренозную пиодермию, узловатую эритему, первичный склерозирующий холангит, респираторный дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых или острый (ARDS), менингит, воспаление всей или части сосудистой оболочки глаза, воспаление радужной оболочки глаза, хориоидит, аутоиммунное гематологическое расстройство, болезнь «трансплантат против хозяина», ангионевротический отек, такой как наследственный ангионевротический отек, повреждение черепного нерва как при менингите, герпес беременных, пемфигоид беременных, мошоночный зуд, аутоиммунное преждевременное нарушение овуляции, внезапную потерю слуха вследствие аутоиммунного состояния, опосредуемые IgE заболевания, такие как анафилаксия, и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит, и/или энцефалит ствола головного мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (GN) с нефротическим синдромом и без него, такой как острый или хронический гломерулонефрит, такой как

первичный GN, опосредуемый иммунной системой GN, мембранозный GN (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный GN или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембранный или мембранозно-пролиферативный GN (MPGN), включая I тип и II тип, и быстро прогрессирующий GN, пролиферативный нефрит, аутоиммунную полигландулярную эндокринную недостаточность, баланит, включая ограниченный плазмноклеточный баланит, баланопостит, кольцевидную эритему, стойкую дисхромическую эритему, мультиформную эритему, кольцевидную гранулему, блестящий лишай, склеротический и атрофический лишай, простой хронический лишай, спинулезный лишай, плоский лишай, ламеллярный ихтиоз, эпидермолитический гиперкератоз, предраковый кератоз, гангренозную пиодерму, аллергические состояния и ответы, пищевые аллергии, лекарственные аллергии, аллергии на укусы насекомых, редкие аллергические расстройства, такие как мастоцитоз, аллергическую реакцию, экзему, включая аллергическую или атопическую экзему, астеатотическую экзему, дисгидротическую экзему и везикулярную ладонно-подошвенную экзему, астму, такую как *asthma bronchiale*, бронхиальная астма и аутоиммунная астма, аллергическая астма и детская астма, состояния, в которые вовлечена инфильтрация Т-клеток и хронические воспалительные ответы, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как фетальные группы крови А-В-О в процессе беременности, хроническое воспалительное заболевание легких, аутоиммунный миокардит, нарушение адгезии лейкоцитов, волчанку, включая волчаночный нефрит, волчаночный церебрит, детскую волчанку, внепочечную волчанку, экстраренальную волчанку, дискоидную волчанку и дискоидную красную волчанку, волчаночную алопецию, SLE, такую как кожная SLE или подострая кожная SLE, неонатальный волчаночный синдром (NLE) и диссеминированная красная волчанка, юношеский сахарный диабет (I типа), включая детский IDDM, сахарный диабет взрослых (диабет II типа), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетический колит, диабетическое поражение крупных артерий, иммунный ответ, ассоциированный с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, в том числе лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулиты, включая васкулит, васкулит крупных сосудов, в том числе ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (Такаясу)), васкулит сосудов среднего калибра (в том числе болезнь Кавасаки и узелковый полиартериит/узелковый периартериит), микроскопический полиартериит, иммуноваскулит, васкулит в ЦНС, кожный васкулит, васкулит при гиперчувствительности, некротизирующий васкулит, такой как системный некротизирующий васкулит и ассоциированный с ANCA васкулит, такой как васкулит или синдром Черджа-Стросса (CSS) и ассоциированный с ANCA васкулит сосудов малого калибра, височный артериит, апластическую анемию, аутоиммунную апластическую анемию, Кумбс-положительную анемию, анемию Дамонда-Блэкфана, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, в том числе аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), пернициозную анемию (*anemia perniciosa*), болезнь Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную(ые) нейтропению(и), цитопении, такие как панцитопения, лейкопения, заболевания, в которые вовлечен диapedез лейкоцитов, воспалительные нарушения в ЦНС, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, синдром множественного поражения органов, такой как вторичные синдромы при септицемии, травме или

геморрагии, заболевания, опосредуемые комплексами антиген-антитело, заболевание, связанное с антителами против клубочковой базальной мембраны, антифосфолипидный синдром, моторный неврит, аллергический неврит,

5 болезнь/синдром Бехчета, синдром Кастельмана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигиод, такой как буллезный пемфигиод и кожный пемфигиод, пемфигус (в том числе обыкновенный пемфигус,

10 листовидный пемфигус, пемфигиод слизистой оболочки и эритематозный пемфигиод), аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, тепловое повреждение вследствие аутоиммунного состояния, преэклампсию, расстройство,

15 вызываемое иммунными комплексами, такое как иммунокомплексный нефрит, опосредуемый антителами нефрит, нейровоспалительные расстройства, полиневропатии, хроническую невропатию, такую как IgM-полиневропатии или IgM-опосредованная невропатия, тромбоцитопению (например, такая как развивается у

20 пациентов с инфарктом миокарда), в том числе тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), посттрансфузионную пурпуру (РТР), индуцированную гепарином тромбоцитопению и аутоиммунную или иммунноопосредуемую тромбоцитопению, в том числе, например, идиопатическую

25 тромбоцитопеническую пурпуру (ИТР), включая хроническую или острую ИТР, склерит, такой как идиопатический кератосклерит, эписклерит, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, в том числе аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз, гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные заболевания, в том числе

30 тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, болезнь Грэйвса, полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные полигландулярные синдромы,

35 например, I типа (или полигландулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, в том числе неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Итона-Ламберта, синдром «негнущегося человека» или «негнущегося субъекта»,

40 энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит или *encephalomyelitis allergica* и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЕАЕ), миастению гравис, такую как ассоциированная с тимомой миастения гравис, церебеллярную дегенерацию, нейромиотонию, опсоклонус или опсоклонус-миоклонус синдром (OMS),

45 и сенсорную невропатию, многоочаговую моторную невропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, пневмонит, такой как лимфоидный интерстициальный

50 пневмонит (LIP), облитерирующий бронхиолит (не зависимый от трансплантата) в противоположность NSIP, синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA-дерматоз, острый лихорадочный

нейтрофильный дерматоз, подроговичный пустулезный дерматоз, преходящий акантолитический дерматоз, цирроз, такой как первичный билиарный цирроз и пневмоцирроз, синдром аутоиммунной энтеропатии, целиакию или глютеиновую

болезнь, спру-целиакию (глютеиновую энтеропатию), рефрактерный спру,

идиопатический спру, криоглобулинемию, такую как смешанная криоглобулинемия, боковой амиотрофический склероз (ALS; болезнь Лу Геринга), заболевание коронарных артерий, аутоиммунное заболевание уха, такое как аутоиммунное

заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунную потерю слуха, полихондрит,

такой как рефрактерный или рецидивирующий, или возвратный полихондрит, легочно-
 альвеолярный протеиноз, синдром Когана /несифилитический интерстициальный
 кератит, паралич Белла, болезнь/синдром Свита, аутоиммунную розацею, боль,
 ассоциированную с опоясывающим лишаем, амилоидоз, незлокачественный
 5 лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-
 клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественную моноклональную гаммапатию
 и моноклональную гаммапатию неясного значения, MGUS), периферическую
 невропатию, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия,
 10 мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, пароксизмальный
 паралич, и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительную миопатию, очаговый или
 сегментный, или очаговый сегментный гломерулосклероз (FSGS), эндокринную
 офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное гепатологическое
 15 расстройство, фибромиалгию, множественную эндокринную недостаточность,
 синдром Шмидта, воспаление надпочечников, атрофию желудка, пресенильную
 деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные
 демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая
 полиневропатия, синдром Дресслера, очаговую алопецию, синдром CREST (кальциноз,
 20 синдром Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия),
 мужское и женское аутоиммунное бесплодие, например, вследствие наличия антител к
 сперматозоидам, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Чагаса,
 ревматическую лихорадку, привычный выкидыш, альвеолит у сельскохозяйственных
 рабочих, полиморфную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга,
 25 легочную аллергию птицеловов, аллергический гранулематозный ангиит,
 доброкачественный лимфоцитарный ангиит, синдром Альпорта, альвеолит, такой как
 аллергический и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легкого,
 трансфузионную реакцию, лепру, малярию, паразитарные заболевания, такие как
 30 лейшманиоз, кипаносомиоз, шистосомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера,
 синдром Каплана, денге, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, диффузный
 интерстициальный фиброз легких, интерстициальный фиброз легких, фиброзирующий
 медиастит, фиброз легких, идиопатический фиброз легких, кистозный фиброз,
 эндофтальмит, возвышенную стойкую эритему, гемолитическую болезнь
 35 новорожденных, эозинофильный фасцит, синдром Шулмана, синдром Фелти,
 филариоз, циклит, такой как хронический циклит, гетерохронический циклит,
 иридоциклит (острый или хронический) или циклит Фукса, пурпuru Геноха-Шенлейна,
 инфекцию вирусом иммунодефицита человека (HIV), SCID, синдром приобретенного
 40 иммунодефицита (AIDS), инфекцию эховирусом, сепсис (синдром системного
 воспалительного ответа (SIRS)), эндотоксемию, панкреатит, тиреотоксикоз, инфекцию
 парвовирусом, инфекцию вирусом краснухи, поствакцинальные синдромы, инфекцию
 врожденной краснухой, инфекцию вирусом Эпштейна-Барра, инфекционный паротит,
 синдром Эванса, аутоиммунную гонадную недостаточность, хорею Сиденгама,
 45 постстрептококковый нефрит, облитерирующий тромбангиит, тиреотоксикоз, сухотку
 спинного мозга, хориоидит, гигантоклеточную полимиалгию, хронический пневмонит
 с гиперчувствительностью, конъюнктивит, такой как весенний катар, сухой
 кератоконъюнктивит и эпидемический кератоконъюнктивит, идиопатический
 50 нефритический синдром, нефропатию с минимальными изменениями,
 доброкачественное семейное повреждение и повреждение при ишемии-реперфузии,
 реперфузию органов при трансплантации, аутоиммунную реакцию в сетчатке,
 воспаление сустава, бронхит, хроническое обструктивное заболевание дыхательных

путей/легких, силикоз, афты, афтозный стоматит, артериосклеротические
 расстройства (церебрально-сосудистая недостаточность), такие как
 артериосклеротическая энцефалопатия и артериосклеротическая ретинопатия,
 асперматогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь Бека, криоглобулинемию,
 5 контрактуру Дюпюитрена, факоанафилактический эндофтальмит, аллергический
 энтерит, узловатую лепрозную эритему, идиопатический паралич лицевого нерва,
 синдром хронической усталости, ревматическую лихорадку, болезнь Хеммена-Рича,
 сенсоневральную потерю слуха, пароксизмальную гемоглобинурию, гипогонадизм,
 10 регионарный илеит, лейкопению, инфекционный моноклеоз, поперечный миелит,
 первичную идиопатическую микседему, нефроз, симпатическую офтальмию,
 гранулематозный орхит, панкреатит, острый полирадикулит, гангренозную
 пиодермию, тиреоидит Кервена, приобретенную атрофию селезенки,
 15 незлокачественную тимому, лимфофолликулярный тимит, витилиго, синдром
 токсического шока, пищевое отравление, состояния, вовлекающие инфильтрацию Т-
 клеток, дефект адгезии лейкоцитов, иммунные ответы, ассоциированные с острой и
 замедленной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами,
 заболевания, вовлекающие диапедез лейкоцитов, синдром полиорганного поражения,
 20 опосредуемые комплексами антиген-антитело заболевания, заболевания,
 направленные против базальной мембраны клубочков, аутоиммунные
 полиэндокринопатии, оофорит, первичную микседему, аутоиммунный атрофический
 гастрит, симпатическую офтальмию, ревматические заболевания, смешанное
 заболевание соединительной ткани, нефротический синдром, инсулит,
 25 полиэндокринную недостаточность, аутоиммунные полигландулярные синдромы,
 включая полигландулярный синдром I типа, идиопатический гипопаратиреоз
 взрослых (АОИ), кардиомиопатию, такую как кардиомиопатия с дилатацией,
 приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохромацитоз, миокардит,
 30 нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный или
 негнойный синусит, острый или хронический синусит, синусит решетчатой кости,
 лобной кости, верхней челюсти или клиновидной кости, аллергический синусит,
 связанное с эозинофилами расстройство, такое как эозинофилия, эозинофилия с
 инфильтрацией в легкие, синдром эозинофилии-миалгии, синдром Леффлера,
 35 хроническую эозинофильную пневмонию, тропическую легочную эозинофилию,
 бронхолегочный аспергиллез, аспергиллому или содержащие эозинофилы гранулемы,
 анафилаксию, спондилоартропатии, серонегативный спондилоартрит,
 полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит,
 40 хронический кожно-слизистый кандидоз склеры и эписклеры, синдром Брутона,
 транзиторную гаммаглобулинемию новорожденных, синдром Вискотта-Олдрича,
 синдром атаксии-телеангиэктазии, ангиэктазию, аутоиммунные нарушения,
 ассоциированные с коллагеновыми заболеваниями, ревматизм, такой как хронический
 артроревматизм, лимфаденит, снижение ответа кровяного давления, сосудистую
 45 дисфункцию, тканевое повреждение, сердечно-сосудистую ишемию, гиперальгезию,
 почечную ишемию, церебральную ишемию и заболевание, сопровождающее
 васкуляризацию, аллергические расстройства, связанные с гиперчувствительностью,
 гломерулонефрит, реперфузионное повреждение, ишемическое реперфузионное
 50 расстройство, реперфузионное повреждение миокарда и других тканей,
 лимфоматозный трахеобронхит, воспалительные дерматозы, дерматозы с острыми
 воспалительными компонентами, полиорганную недостаточность, буллезные
 заболевания, почечный кортикальный некроз, острый гнойный менингит или другие

воспалительные расстройства центральной нервной системы, окулярные и орбитальные воспалительные расстройства, синдромы, ассоциированные с трансфузией гранулоцитов, индуцированную цитокинами токсичность, нарколепсию, острое тяжелое воспаление, хроническое трудноизлечимое воспаление, пиелит, эндартериальную гиперплазию, пептическую язву, вальвулит и эндометриоз. Другие примеры, которые в некоторых случаях охватывают примеры, перечисленные выше, включают в качестве неограничивающих примеров аутоиммунные ревматологические расстройства (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как SLE и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, антифосфолипидный синдром и псориатический артрит), аутоиммунные желудочно-кишечные расстройства и расстройства печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютенная болезнь), васкулит (такой как, например, ассоциированный с ANCA васкулит, включая васкулит Черджа-Стросса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические расстройства (такие как, например, рассеянный склероз, опсоклонус-миоклонус синдром, миастения гравис, оптический нейромиелит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полиневропатии), почечные расстройства (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические расстройства (такие как, например, псориаз, крапивница, сыпь, обыкновенный пемфигус, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические расстройства (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (такие как, например, заболевание внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантацию органов, GVHD и аутоиммунные эндокринные расстройства (такие как, например, связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)).

В одном из аспектов изобретение относится к композиции, содержащей одно или несколько антител по изобретению и носитель. В одном из вариантов осуществления носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном из аспектов изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела к OX40L по изобретению.

В одном из аспектов изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту по изобретению.

В одном из аспектов изобретение относится к композициям, содержащим одну или несколько нуклеиновых кислот по изобретению и носитель. В одном из вариантов осуществления носитель является фармацевтически приемлемым.

В одном из аспектов изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор по изобретению. Вектор может относиться к любому типу, например рекомбинантному вектору, такому как экспрессирующий вектор. Можно использовать любые из множества клеток-хозяев. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин является прокариотической клеткой, например, *E. coli*. В одном из вариантов осуществления клетка-хозяин является эукариотической клеткой,

например клеткой млекопитающего, такой как клетка яичника китайского хомяка (CHO).

В одном из аспектов изобретение относится к способам получения антитела по изобретению. Например, изобретение относится к способам получения антитела к OX40L (которое, как определено в данном описании, включает полноразмерное антитело и его фрагменты), где указанный способ включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора по изобретению, кодирующего указанное антитело, и выделение указанного антитела.

В одном из аспектов изобретение относится к изделию, содержащему контейнер, и композиции, содержащейся в контейнере, где композиция содержит одно или несколько антител к OX40L по изобретению. В одном из вариантов осуществления композиция содержит нуклеиновую кислоту по изобретению. В одном из вариантов осуществления композиция, содержащая антитело, дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов осуществления изделие по изобретению дополнительно содержит инструкции по введению композиции (например, антител) субъекту (такие как инструкции для любого из описанных здесь способов).

В одном из аспектов изобретение относится к набору, содержащему первый контейнер, содержащий композицию, содержащую одно или несколько антител к OX40L по изобретению, и второй контейнер, содержащий буфер. В одном из вариантов осуществления буфер является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов осуществления композиция, содержащая антитело, дополнительно содержит носитель, который в некоторых вариантах осуществления является фармацевтически приемлемым. В одном из вариантов осуществления набор дополнительно содержит инструкции для введения композиции (например, антител) субъекту.

В одном из аспектов изобретение относится к применению антител к OX40L по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

В одном из аспектов изобретение относится к применению нуклеиновой кислоты по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

В одном из аспектов изобретение относится к применению экспрессирующего вектора по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное

заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

В одном из аспектов изобретение относится к применению клетки-хозяина по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

В одном из аспектов изобретение относится к применению изделия по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

В одном из аспектов изобретение относится к применению набора по изобретению для получения лекарственного средства для терапевтического и/или профилактического лечения расстройства, такого как иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку.

Изобретение относится к способам и композициям, пригодным для модулирования состояний заболевания, связанного с экспрессией и/или активностью OX40L, таких как повышение экспрессии и/или активности, или нежелательная экспрессия и/или активность.

Способы по изобретению можно применять для воздействия на любое подходящее патологическое состояние. Типичные расстройства описаны в данном описании и включают иммунные расстройства.

Способы по изобретению могут дополнительно включать дополнительные стадии лечения. В одном из аспектов изобретение относится к способам, включающим введение эффективного количества антитела к OX40L в сочетании с эффективным количеством другого терапевтического средства. Например, в одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает стадию, в которой являющаяся мишенью клетка и/или ткань подвергается лечению стероидами. Антитело к OX40L можно вводить периодически или в сочетании с другим терапевтическим средством, которое является эффективным для этих целей, или в той же самой композиции, или в виде отдельных композиций. Введение антитела к OX40L и другого терапевтического средства можно осуществлять одновременно, например, в виде единой композиции или в виде двух или более отдельных композиций с использованием одинаковых или разных способов введения. Альтернативно или дополнительно введение можно осуществлять последовательно, в любом порядке. Альтернативно или дополнительно стадии можно осуществлять в виде сочетания как последовательного, так и одновременного, в любом порядке. В конкретных вариантах осуществления между

введениями двух или нескольких композиций могут присутствовать интервалы, варьирующие от минут до суток, до недель, до месяцев. Например, другое терапевтическое средство можно вводить вначале, перед антителами к OX40L. Однако также предполагается одновременное введение или введение антитела к OX40L вначале. В конкретных вариантах осуществления между введениями двух или нескольких композиций могут присутствовать интервалы, варьирующие от минут до суток, до недель, до месяцев.

В другом аспекте изобретение относится к способам детекции OX40L, где способы включают детектирование комплекса «OX40L-антитело к OX40L» в образце. Термин «детекция», как используют в настоящем описании, включает качественную и/или количественную детекцию (уровни измерения) по сравнению с контролем или без сравнения с ним.

В другом аспекте изобретение относится к способам диагностики расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью OX40L, где способы включают детектирование комплекса «OX40L-антитело к OX40L» в биологическом образце от пациента, обладающего расстройством или подозреваемого в обладании им. В некоторых вариантах осуществления экспрессия OX40L является повышенной экспрессией или патологической экспрессией. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой иммунное расстройство.

В другом аспекте изобретение относится к любым антителам к OX40L, описанным здесь, где антитело к OX40L содержит детектируемую метку.

В другом аспекте изобретение относится к комплексу любых антител к OX40L, описанных здесь, и OX40L. В некоторых вариантах осуществления комплекс является комплексом *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления антитело к OX40L метят детектируемой меткой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1А и 1В представлены аминокислотные последовательности переменных областей мышинового моноклонального антитела к OX40L человека 8E12. А - переменная область легкой цепи 8E12 (SEQ ID NO:13). В - переменная область тяжелой цепи 8E12 (SEQ ID NO:15). Аминокислоты пронумерованы согласно Kabat.

На фиг. 2А и 2В представлены аминокислотные последовательности переменных областей мышинового моноклонального антитела к OX40L человека 13G5. А - переменная область легкой цепи 13G5 (SEQ ID NO:14). В - переменная область тяжелой цепи 13G5 (SEQ ID NO:16). Аминокислоты пронумерованы согласно Kabat.

На фиг. 3 графически показано, что введение моноклональных антител к OX40L 8E12 и 13G5 конкурентно ингибировало связывание рецептора OX40 человека с OX40L человека.

На фиг. 4 графически показано, что введение моноклональных антител к OX40L 8E12 и 13G5 ингибировало пролиферацию Т-клеток в анализе на основе клеток.

На фиг. 5 графически показано, что введение моноклональных антител к OX40L 8E12 и 13G5 ингибировало выработку IL-2 Т-клетками памяти.

На фиг. 6 графически показано, что введение моноклональных антител к OX40L 8E12 и 13G5 ингибировало выживаемость активированных Т-клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение здесь относится к антителам к OX40L, которые пригодны, например, для лечения или профилактики состояний заболевания, связанных с экспрессией и/или активностью OX40L, как, например, повышение экспрессии и/или активности или нежелательная экспрессия и/или активность. В некоторых вариантах осуществления

антитела по изобретению применяют для лечения иммунного расстройства (такого как астма, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системная красная волчанка).

В другом аспекте антитела к OX40L по изобретению находят применение в качестве реагентов для детекции и/или выделения OX40L, как, например, детекция OX40L в различных типах тканей и клеток.

Изобретение дополнительно относится к способам получения антител к OX40L, полинуклеотидам, кодирующим антитела к OX40L и клеткам, содержащим полинуклеотиды, кодирующие антитела к OX40L.

Общие способы

Описанные или цитированные здесь способы и процедуры, как правило, специалисты в данной области хорошо понимают и применяют в общепринятой практике с использованием общепринятых способов, таких как, например, широко используемые способы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); сериях *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, и *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Определения

«Выделенные» антитела представляют собой антитела, которые были выявлены и выделены и/или извлечены из компонента их естественных окружающих условий. Загрязняющие компоненты их естественных окружающих условий представляют собой вещества, которые могут препятствовать применению антител для диагностики или лечения и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитела очищают (1) более чем до 95 мас.% антител, как определяют способом Лоури, и наиболее предпочтительно, более чем до 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси голубого или предпочтительно окрашивания серебром. Выделенные антитела включают антитела *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку в этом случае отсутствует, по меньшей мере, один компонент условий естественного окружения антител. Однако, как правило, выделенные антитела получают посредством, по меньшей мере, одной стадии очистки.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которую выявляют и отделяют, по меньшей мере, от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в природном источнике нуклеиновой кислоты антител. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты находится в другой форме или окружающих условиях, чем в природе. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты таким образом отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, которая существует в природных клетках. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, которые обычно экспрессируют антитело, где, например, расположение молекулы нуклеиновой кислоты на хромосоме отличается от

расположения в природных клетках.

Термин «нумерация остатка вариабельного домена как у Kabat» или «нумерация положения аминокислоты как у Kabat», и его вариации, относится к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи собрания данных по антителам у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). При использовании этой системы нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать единственную вставку аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.п. согласно Kabat) после остатка 82 тяжелой цепи FR. Нумерацию остатков по Kabat можно определить для данных антител посредством выравнивания областей гомологии последовательности антител со «стандартной» занумерованной по Kabat последовательностью.

«Аффинность связывания», как правило, относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одиночным участком связывания молекулы (например, антитела) и связывающимся с ним партнером (например, антигеном). Если не указано иначе, как используют в настоящем описании, «аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X по отношению к ее партнеру Y можно, как правило, представить посредством константы диссоциации (K_d). Аффинность можно измерять общепринятыми способами, известными в данной области, включая описанные здесь способы. Антитела с низкой аффинностью, как правило, связываются с антигеном медленно и обладают тенденцией к легкой диссоциации, в то время как антитела с высокой аффинностью, как правило, связываются с антигеном быстрее и обладают тенденцией дольше оставаться связанными. Множество способов измерения аффинности связывания известно в данной области, любые из которых можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные наглядные варианты осуществления описаны далее.

В одном из вариантов осуществления « K_d » или «величину K_d » согласно этому изобретению измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченного антигена (RIA), осуществляемого с Fab-вариантом интересующих антител и их антигеном, как описано с помощью следующего анализа, которым измеряют аффинность связывания в растворе Fab с антигеном посредством уравнивания Fab минимальной концентрацией (^{125}I)-меченного антигена в присутствии серийного разведения немеченого антигена, с последующим улавливанием связанного антигена на планшете, покрытом антителами к Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Для определения условий анализа планшеты для микротитрования (Dyplex) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл улавливающих антител анти-Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбонате натрия (pH 9,6) и затем забивают 2% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина в PBS в течение от двух до пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующем планшете (Nunc № 269620) 100 пМ или 26 пМ [^{125}I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в соответствии с оценкой антител анти-VEGF, Fab-12, у Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599).

Представляющий интерес Fab затем инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, 65 часов), чтобы гарантировать достижение равновесия. После этого смеси переносят в планшеты для улавливания, чтобы инкубировать при комнатной температуре (например, в течение

одного часа). Раствор затем удаляют и планшеты промывают восемь раз 0,1% твином-20 в PBS. После того как планшеты высушивают, добавляют сцинтиллятор (MicroScint-20; Packard) из расчета 150 мкл/лунка и снимают показания с планшетоов на гамма-счетчике Topcount (Packard) в течение десяти минут.

Концентрации каждого Fab, которые дают менее чем 20% или равняются 20% от максимального связывания, выбирают для использования в анализах конкурентного связывания. Согласно другому варианту осуществления K_d или величину K_d измеряют с использованием способов анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах резонансного сигнала (RU). В кратком изложении биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью течения 5 мкл/минута для достижения приблизительно 10 единиц резонансного сигнала (RU) связанного белка. После инъекции антигена 1 М этаноламин инъецируют для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% твином-20 (PBST) при 25°C при скорости течения приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания один к одному Ленгмюра (программное обеспечение для вычисления BIAcore, версия 3.2) посредством одновременной аппроксимации сенсограммы ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . Смотри, например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol 293:865-881. Если скорость ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ в вышеописанном анализе на основе поверхностного плазмонного резонанса, то скорость ассоциации можно определить с использованием способа тушения флуоресценции, которым измеряют повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нМ; испускание = 340 нМ, полоса пропускания 16 нМ) при 25°C 20 нМ антител к антигену (Fab-форма) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена при измерении в спектрометре, таком как спектрофотометр, оборудованный остановленной струей (Aviv Instruments), или спектрофотометре SLM-Aminco серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

«Скорость ассоциации» или «скорость связывания», или « k_{on} », согласно этому изобретению можно также определить тем же способом поверхностного плазмонного резонанса, описанного выше с использованием BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах резонансного сигнала (RU). В кратком изложении биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со

скоростью течения 5 мкл/минута для достижения приблизительно 10 единиц
 резонансного сигнала (RU) связанного белка. После инъекции антигена 1 М
 этаноламин инъецируют для блокирования непрореагировавших групп. Для
 измерений кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ)
 5 инъецируют в PBS с 0,05% твином-20 (PBST) при 25°C при скорости течения
 приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off})
 вычисляют с использованием простой модели связывания один к одному Ленгмюра
 (программное обеспечение для вычисления BIAcore, версия 3.2) посредством
 10 одновременной аппроксимации сенсограммы ассоциации и диссоциации. Равновесную
 константу диссоциации (K_d) вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . Смотри, например,
 Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol 293:865-881. Если скорость ассоциации превышает
 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ в вышеописанном анализе на основе поверхностного плазмонного
 15 резонанса, то скорость ассоциации предпочтительно определяют с использованием
 способа тушения флуоресценции, которым измеряют повышение или снижение
 интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нМ; испускание = 340
 нМ, полоса пропускания 16 нМ) при 25°C 20 нМ антител к антигену (Fab-форма)
 в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена при измерении в
 20 спектрометре, таком как спектрофотометр, оборудованный остановленной
 струей (Aviv Instruments), или спектрофотометре SLM-Aminco серии 8000
 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

Термин «вектор», как используют в настоящем описании, предназначен для
 обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую
 25 нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет
 собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в
 которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора
 представляет собой фаговый вектор. Другой тип вектора представляет собой
 30 вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный
 геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в
 которую их вводят (например, бактериальные векторы, обладающие бактериальной
 точкой начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы
 (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно интегрировать в геном
 35 клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом они реплицируются
 вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять
 экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы
 обозначают здесь как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто,
 40 «рекомбинантные векторы»). Как правило, экспрессирующие векторы, которые
 используют в способах рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмиды. В
 настоящем описании «плазида» и «вектор» можно использовать взаимозаменяемо,
 так как плазида является наиболее используемой формой вектора в общепринятой
 практике.

45 «Полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», как применяют взаимозаменяемо в
 данном описании, относится к полимерам нуклеотидов любой длины и включает ДНК
 и РНК. Нуклеотиды могут являться дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами,
 модифицированными нуклеотидами или основаниями, и/или их аналогами, или любым
 50 веществом, который можно встроить в полимер с помощью ДНК- или РНК-
 полимеразы или с помощью синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать
 модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги.
 При наличии модификацию структуры нуклеотида можно осуществить перед сборкой

полимера или после нее. Последовательность нуклеотидов можно прерывать ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после синтеза, как, например, посредством конъюгации с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэпы», замену одного или

5 нескольких из встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации незаряженными мостиками (например, метилфосфонатами, фосфотриэфирами, фосфоамидами, карбаматами и т.п.) и заряженными мостиками (например, фосфоротиоатами, фосфородитиоатами и

10 т.п.), модификации, содержащие подвешенные компоненты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.), модификации интеркаляторами (например, акридином, псораленом и т.п.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.п.), модификации, содержащие алкилирующие агенты,

15 модификации модифицированными мостиками (например, альфа-аномерными нуклеиновыми кислотами и т.п.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Далее, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, можно заменить, например, фосфонатными группами, фосфатными

20 группами, защищенными общепринятыми защитными группами, или активированными для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или их можно конъюгировать с твердыми или полутвердыми носителями. 5'- и 3'-концевой ОН можно фосфорилировать или заместить аминами или органическими компонентами блокирующей группы из 1-20 атомов углерода. Можно

25 также получить производные других гидроксидов с общепринятыми защитными группами. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров рибоз или дезоксирибоз, которые широко известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические

30 аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные формы сахаров, фуранозные формы сахаров, седогептулозы, ациклические аналоги и основные аналоги нуклеозидов, такие как метилрибозид. Один или несколько фосфодиэфирных мостиков можно заменить альтернативными связующими группами. Эти альтернативные связующие группы

35 включают в качестве неограничивающих примеров варианты осуществления, где фосфат замещен посредством P(O)S(«тиоат»), P(S)S («дитиоат»), «(O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C),

40 необязательно содержащий эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралкил. Не требуется, чтобы все связи в полинуклеотиде являлись идентичными. Предшествующее описание применимо ко всем упоминаемым здесь полинуклеотидам, включая РНК и ДНК.

«Олигонуклеотид», как используют в настоящем описании, как правило, относится

45 к коротким, как правило, одноцепочечным, как правило, синтетическим полинуклеотидам, которые, как правило, но не обязательно, состоят из менее чем приблизительно 200 нуклеотидов в длину. Термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» не являются взаимоисключающими. Вышеприведенное описание для полинуклеотидов в равной степени и полностью применимо для олигонуклеотидов.

50

Термин «лиганд ОХ40» (взаимозаменяемо обозначаемый как «ОХ40L»), как используют в настоящем описании, относится, если только конкретно или контекстуально не указано иначе, к любому природному или вариантному (или

природному или синтетическому) полипептиду OX40L. Термин «природная последовательность» специфически включает встречающиеся в природе усеченные или секретируемые формы (например, последовательность внеклеточного домена), встречающиеся в природе варианты формы (например, альтернативно сплайсированные формы) и встречающиеся в природе аллельные варианты. Термин «OX40L дикого типа», как правило, относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка OX40L. Термин «последовательность OX40L дикого типа», как правило, относится к аминокислотной последовательности, представленной во встречающемся в природе OX40L.

Термин «рецептор OX40» (взаимозаменяемо обозначаемый как «OX40»), как используют в настоящем описании, относится, если только конкретно или контекстуально не указано иначе, к любому природному или вариантному (или природному или синтетическому) полипептиду OX40. Термин «природная последовательность» специфически включает встречающиеся в природе усеченные или секретируемые формы (например, последовательность внеклеточного домена), встречающиеся в природе варианты формы (например, альтернативно сплайсированные формы) и встречающиеся в природе аллельные варианты. Термин «OX40 дикого типа», как правило, относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка OX40. Термин «последовательность OX40 дикого типа», как правило, относится к аминокислотной последовательности, представленной во встречающемся в природе OX40.

Термины «антитело» и «иммуноглобулин» используют взаимозаменяемо в самом широком смысле и включают моноклональные антитела (например, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела до тех пор, пока они обладают требуемой биологической активностью) и могут также включать определенные фрагменты антител (как здесь описано более подробно). Антитела могут являться человеческими, гуманизированными и/или аффинно-зрелыми.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что последовательности определенных частей вариабельных доменов значительно отличаются среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность не является равномерно распределенной на протяжении вариабельных доменов антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR), или гипервариабельными областями, в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных доменов называют каркасными (FR). Каждый из вариабельных доменов природных тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR-области, в значительной степени принимающие конфигурацию β -слоя, соединенную тремя CDR, которые формируют петли, соединяющие структуру β -слоев и в некоторых случаях формирующие ее часть. CDR в каждой цепи расположены вместе в непосредственной близости от областей FR и совместно с CDR другой цепи участвуют в формировании антигенсвязывающего участка антител (смотри Kabat et al., Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но они обладают различными эффекторными функциями, такими как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

Расщепление папаином антител дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab-фрагментами», каждый с единственным антигенсвязывающим участком, и остаточный «Fc-фрагмент», название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает F(ab')₂-фрагмент, который обладает двумя антигенсвязывающими участками, и он все еще способен образовывать поперечные шивки с антигеном.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. В двухцепочечной разновидности Fv эта область состоит из димера вариабельного домена одной тяжелой и одной легкой цепей с прочной нековалентной связью. В одноцепочечной разновидности Fv вариабельный домен одной тяжелой и одной легкой цепей можно ковалентно связать посредством гибкого пептидного линкера, так что легкую и тяжелую цепи можно соединить в «димерную» структуру, аналогичную структуре в двухцепочечной разновидности Fv. Именно в этой конфигурации три CDR каждого вариабельного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего участка на поверхности димера VH-VL. В совокупности, шесть CDR придают антигенсвязывающую специфичность антителам. Однако даже отдельный вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с меньшей аффинностью, чем полный связывающий участок.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на С-конце CH1-домена тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антител. Fab'-SH здесь обозначают как Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несет(ут) свободную тиоловую группу. F(ab')₂-фрагменты антител исходно получали в виде пар Fab'-фрагментов, которые обладают шарнирными цистеинами между собой. Также известны другие химические шивки фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) из любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа (κ) и ламбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существуют пять главных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно далее разделить на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют разным классам иммуноглобулинов, называют α, δ, ε, γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Фрагменты антител» содержат только часть интактных антител, где часть предпочтительно сохраняет, по меньшей мере, одну, предпочтительно большинство или все функции, в норме связанные с этой частью, когда она присутствует в интактных антителах. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; димерные антитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В одном из вариантов осуществления фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий участок интактного антитела и таким образом сохраняет способность связываться с антигеном. В другом варианте осуществления фрагмент антител, например фрагмент, который содержит Fc-область, сохраняет, по меньшей

мере, одну из биологических функций, в норме связанных с Fc-областью, когда она присутствует в интактных антителах, такую как связывание FcRn, модулирование времени полужизни антител, функцию ADCC и связывания комплемента. В одном из вариантов осуществления фрагмент антител является моновалентным антителом, которое обладает *in vivo* временем полужизни, по существу, сходным с интактным антителом. Например, такой фрагмент антитела может содержать антигенсвязывающее плечо, связанное с Fc-последовательностью, способной придавать *in vivo* стабильность фрагменту.

Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV», при использовании в данном описании относится к областям вариабельного домена антител, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или формируют структурно оформленные петли. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных областей; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Используют ряд определений гипервариабельной области, и они рассмотрены в данном описании. По Kabat, области, определяющие комплементарность (CDR), определяют на основе вариабельности последовательности, и их используют чаще всего (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Вместо этого Chothia ссылается на местоположение структурных петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и их используют в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. «Контактные» гипервариабельные области определяют на основе анализа доступных кристаллических структур комплексов.

Гипервариабельные области могут содержать «расширенные гипервариабельные области», как указано далее: 24-36 (L1), 46-56 (L2) и 89-97 (L3) в VL, и 26-35 (H1), 47-66 или 49-66, или от 50 до 66 (H2), и 93-101 или 93-102 (H3) в VH. Остатки вариабельного домена занумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений.

«Каркасные» или «FR-» остатки являются такими остатками вариабельного домена, которые отличаются от остатков гипервариабельной области, как определено в данном описании.

«Гуманизированные» формы не являющихся человеческими (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. В основном гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменяют остатками гипервариабельной области видов, не относящихся к человеку (донорные антитела), таких как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, которые обладают требуемой специфичностью, аффинностью и активностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не представлены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации проводят для дополнительного улучшения свойств антител. Как правило, гуманизированные антитела содержат по существу все, по меньшей мере, из одного и, как правило, из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR представляют собой

последовательности FR иммуноглобулина человека. Также гуманизированные антитела необязательно содержат, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека.

Для более подробной информации смотри Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986);

5 Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Смотри также следующие цитированные здесь обзорные статьи и ссылки: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

10 «Химерные» антитела (иммуноглобулины) обладают частью тяжелой и/или легкой цепи, идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) является(ются) идентичной(ыми) или гомологичной(ыми) соответствующим последовательностям в
15 антителах, полученных из других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментов таких антител, при условии, что они обладают требуемой биологической активностью (патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Как используют в настоящем описании, гуманизированные антитела относятся к подклассу химерных антител.

«Одноцепочечные Fv-» или «scFv-» фрагменты антител содержат VH- и VL-домены антител, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, который позволяет scFv формировать требуемую структуру для связывания
25 антигена. Для обзора по scFv смотри Pluckthun, в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

«Антиген» является заранее определенным антигеном, с которым антитела могут
30 селективно связываться. Антигеном-мишенью может являться полипептид, углевод, нуклеиновая кислота, липид, гаптен или другое встречающееся в природе или синтетическое соединение. Предпочтительно антиген-мишень является полипептидом.

Термин «димерные антитела» относится к малым фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где фрагменты содержат вариабельный домен
35 тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) на той же самой полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой
40 цепи и формировать два антигенсвязывающих участка. Димерные антитела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

«Антитела человека» представляют собой антитела, которые обладают аминокислотной последовательностью, которая соответствует последовательности
45 антител, вырабатываемых человеком, и/или которые получают с использованием любых способов получения антител человека, как описано в данном описании. Это определение антител человека специфически исключает гуманизированные антитела, содержащие не являющиеся человеческими антигенсвязывающие остатки.

50 «Аффинно-зрелые» антитела представляют собой антитела с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких своих CDR, что приводит к повышению аффинности антител по отношению к антигену по сравнению с родительскими антителами, которые не обладают этим(и) изменением(ями).

Предпочтительные аффинно-зрелые антитела обладают наномолярными или даже пикомолярными значениями аффинности по отношению к антигену-мишени.

Аффинно-зрелые антитела получают с помощью способов, известных в данной области. В Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) описано аффинное созревание при перестановке VH- и VL-доменов. Случайный мутагенез остатков в CDR и/или каркасных остатков описан в Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

«Эффекторные функции» антител относятся к таким видам биологической активности, которые являются свойственными Fc-области (природной последовательности Fc-области или варианту аминокислотной последовательности Fc-области) антител и варьируют в зависимости от изотипа антител. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и активацию B-клеток.

«Антителозависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые Ig, связанные с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, естественных киллерных (NK) клетках, нейтрофилах и макрофагах), вызывают специфичное для этих цитотоксических эффекторных клеток связывание с несущей антиген клеткой-мишенью и затем уничтожают клетки-мишени посредством цитотоксинов. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для такого уничтожения. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Для оценки активности представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно осуществить анализ ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337, или в патенте США № 6737056, Presta. Пригодные для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

«Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют, по меньшей мере, FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые осуществляют ADCC, включают в себя моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, цитотоксические T-клетки и нейтрофилы, при этом предпочтительными являются PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки можно выделять из естественного источника, например из крови.

Терминами «Fc-рецептор» или «FcR» описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антител. Предпочтительным FcR является FcR человека с природной последовательностью. Более того, предпочтительным FcR является FcR, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов

FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно-сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые обладают сходными аминокислотными последовательностями, которые отличаются преимущественно своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM) (смотри обзор M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). К термину «FcR» в настоящем описании относятся другие FcR, том числе FcR, которые будут выявлены в будущем. Термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. В WO00/42072 (Presta) описаны варианты антител с повышенным или сниженным связыванием с FcR. Содержание этой патентной публикации, в частности, приведено здесь в качестве ссылки. Смотри также Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

Известны способы измерения связывания с FcRn (смотри, например, Ghetie 1997, Hinton 2004). Можно анализировать связывание с FcRn человека *in vivo* и время полужизни в сыворотке полипептидов, связывающихся с высокой аффинностью с FcRn человека, например, на трансгенных мышах или трансфицированных линиях клеток человека, экспрессирующих FcRn человека, или на приматах, которым вводят Fc-варианты полипептидов.

«Комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического каскада комплемента начинается со связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с распознаваемым ими антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывать C1q описаны в патенте США № 6194551B1 и WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций, в частности, приведено здесь в качестве ссылки. Смотри также, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

«Блокирующие» антитела или «антитела-антагонисты» представляют собой антитела, которые ингибируют или снижают биологическую активность антигена, с которым они связываются. Предпочтительные блокирующие антитела или антитела-антагонисты по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

«Расстройство» или «заболевание» является любым состоянием, на которое, вероятно, оказывает благоприятное действие лечение веществом/молекулой или способом по изобретению. Оно включает хронические и острые расстройства или заболевания, включающие такие патологические состояния, которые делают предрасположенным млекопитающее к рассматриваемому расстройству. Неограничивающие примеры расстройств, которые подлежат лечению по данному описанию, включают астму, атопический дерматит, аллергический ринит,

воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз и системную красную волчанку.

«Аутоиммунное заболевание» в данном описании представляет собой заболевание или расстройство, возникающее в собственных тканях индивидуума и направленное против них, или отдельный его признак или его проявление, или состояние, возникающее как его следствие. Для многих из этих аутоиммунных и воспалительных расстройств может существовать ряд клинических и лабораторных признаков, включая в качестве неограничивающих примеров, гипергаммаглобулинемию, высокие уровни аутоантител, отложения комплексов антиген-антитело в тканях, положительный эффект от лечения кортикостероидами или иммуносупрессорами и скопления лимфоидных клеток в пораженных тканях.

Как используют в настоящем описании, «лечение» относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения заболевания индивидуума или клетки, подвергаемых лечению, и его можно осуществлять или для профилактики, или в ходе течения клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидивирования заболевания, смягчение симптомов, уменьшение любых непосредственных или опосредованных патологических последствий заболевания, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению применяют для задержки развития заболевания или расстройства.

«Индивидуум» является позвоночным животным, предпочтительно млекопитающим, более предпочтительно человеком. Млекопитающие включают в качестве неограничивающих примеров сельскохозяйственных животных (таких как коровы), животных, используемых в спорте, домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс.

«Млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных из зоопарка, используемых в спорте или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно животное является человеком.

«Эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата.

«Терапевтически эффективное количество» вещества/молекулы по изобретению, агониста или антагониста может варьировать вследствие факторов, таких как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, и способности вещества/молекулы, агониста или антагониста вызывать требуемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество является также количеством, при котором любые токсические или вредные эффекты вещества/молекулы, агониста или антагониста перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, так как профилактическую дозу используют у субъектов перед заболеванием или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Термин «цитотоксическое средство», как используют в настоящем описании,

относится к веществу, которое ингибирует функционирование клеток или препятствует ему и/или вызывает разрушение клеток. Предполагается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства, например метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие средства, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, в том числе их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Тумороцидное средство вызывает разрушение опухолевых клеток.

«Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, пригодное для лечения рака. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид ЦИТОКСАН®; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогинины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабиол (дронабинол, МАРИНОЛ®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан (ГИКАМТИН®), СРТ-11 (иринотекан, КАМПТОСАР®), ацетилкамптотецин, скополетин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреастатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотные аналоги горчичного газа, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамид оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднемустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма1I и калихеамицин омега1I (смотри, например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); динемидин, в том числе динемидин А, эсперамицин; а также хромофор неокарциностантин и сходные хромофоры хромопротеиновых эндиинового антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, декторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин АДРИАМИЦИН® (в том числе морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностантин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин,

метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон

пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию коры надпочечников, такие как аминоклотеимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил;

бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфомитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK[®] (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триакивон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндезин (ЭЛДИЗИН[®], ФИЛДИЗИН[®]); дакарбазин; манномустин; митобронитол;

митолактон; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); тиотепу; таксоиды, например паклитаксел ТАКСОЛ[®] (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), сконструированный на основе альбумина препарат из наночастиц паклитаксела, без кремофора, ABRAXANE[™] (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и доцетаксел ТЕКСОТЕР[®] (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (ГЕМЗАР[®]); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (ВЕЛБАН[®]); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ОНКОВИН[®]), оксалиплатин;

лейковорин; винорелбин (НАВЕЛБИН[®]); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклотеимид; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (КСЕЛОДА[®]); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленного; а также сочетания двух или более из вышеперечисленного, такие как СНОР, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращение для режима лечения оксалиплатином (ЭЛОКСАТИН[™]) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Также в это определение включены антигормональные средства, которые действуют посредством регуляции, снижения, блокирования или ингибирования воздействий гормонов, которые могут стимулировать рост раковых опухолей, и их часто используют в виде системного лечения или лечения всего организма. Они могут сами являться гормонами. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (в том числе тамоксифен НОЛВАДЕКС[®]), ЭВИСТУ[®], ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен ФАРЕСТОН[®]; антипрогестероны; отрицательные регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); средства, которые действуют, тормозя или прекращая функционирование яичников, например агонисты лютеинизирующего гормона-высвобождающего гормона (LHRH), такие как ЛУПРОН[®] и леупролида ацетат

ЭЛИГАРД[®], гозерелина ацетат, бузерелина ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, магестрола ацетат МЕГАС[®], экземестан АРОМАЗИН[®], форместан, фадрозол, ворозол РИВИЗОР[®], летрозол ФЕМАРА[®] и анастрозол АРИМИДЕКС[®]. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает бифосфонаты, такие как клодронат (например, БОНЕФОС[®] или ОСТАК[®]), этидронат ДИДРОКАЛ[®], NE-58095, золедроновая кислота/золедронат ЗОМЕТА[®], алендронат ФОСАМАКС[®], памидронат АРЕДИЯ[®], тилудронат СКЕЛИД[®] или ризедронат АКТОНЕЛ[®]; а также троксацитабин (аналог нуклеозида цитозина на основе 1,3-диоксолаана); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в нарушенную клеточную пролиферацию, таких как, например, *PKC-альфа*, *Raf*, *H-Ras*, и ген рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина ТЕРАТОП[®] и вакцины для генной терапии, например вакцина АЛЛОВЕКТИН[®], вакцина ЛЕУВЕКТИН[®] и вакцина ВАКСИД[®]; ингибитор топоизомеразы 1 ЛУРТОТЕКАН[®]; АБАРЕЛИКС[®] gmRN; лапатиниб дитозилат (низкомолекулярный двойной ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеупомянутого.

«Средство ингибирования роста» при использовании в данном описании относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки (такой как клетка, экспрессирующая OX40L), или *in vitro*, или *in vivo*. Таким образом, средство ингибирования роста может являться средством, которое значительно снижает процентную долю клеток (таких как клетка, экспрессирующая OX40L) в S-фазе. Примеры средств, ингибирующих рост, включают средства, которые блокируют прохождение клеточного цикла (на другой стадии по сравнению с S-фазой), такие как средства, которые индуцируют остановку в G1 и остановку в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Те средства, которые вызывают остановку в G1, также в качестве побочного результата вызывают остановку в S-фазе, например средства, алкилирующие ДНК, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ара-С. Дополнительную информацию можно найти в *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, озаглавленном «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в особенности р. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми лекарственными средствами, которые оба получены из тисса. Доцетаксел (ТАКСОТЕР[®], Rhone-Poulenc Rorer), полученный из европейского тисса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (ТАКСОЛ[®], Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки путем предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

«Доксорубин» является антрациклиновым антибиотиком. Полное химическое название доксорубина представляет собой (8S-цис)-10-[(3-амино-2,3,6-тридезокси-

α -L-ликсогексапиранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксияцетил)-1-метокси-5,12-нафтацендион.

Термин «полипептид, содержащий Fc-область» относится к полипептиду, такому как антитела или иммуноадгезин (смотри определения ниже), который содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области можно удалить, например, в ходе очистки полипептида или рекомбинантной инженерией нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Таким образом, композиция, содержащая полипептид, обладающий Fc-областью согласно этому изобретению, может содержать полипептиды с K447, со всеми удаленными K447, или смесь полипептидов с остатком K447 и без него.

Композиции по изобретению и способы их получения

Это изобретение относится к композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие антитела к OX40L; и полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие антитела к OX40L. Как используют в настоящем описании, композиции содержат одно или несколько антител, которые связываются с OX40L, и/или один или несколько полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или несколько антител, которые связываются с OX40L. Эти композиции могут дополнительно содержать подходящие носители, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области.

Изобретение также включает варианты осуществления с выделенными антителами и полинуклеотидами. Изобретение также включает варианты осуществления, по существу, с чистыми антителами и полинуклеотидами.

Антитела к OX40L по изобретению являются предпочтительно моноклональными. Также в объем изобретения входят фрагменты представленных в настоящем описании антител к OX40L Fab, Fab', Fab'-SH и F(ab')₂. Эти фрагменты антител можно получать традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или их можно получать рекомбинантными способами. Такие фрагменты антител могут являться химерными или гуманизированными. Эти фрагменты пригодны для диагностических и терапевтических целей, описанных ниже.

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, содержащие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественно возникающих мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, модифицирующий термин «моноклональные» указывает на характер антител, поскольку они не являются смесью отдельных антител.

Моноклональные антитела к OX40L по изобретению можно получать с использованием гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или их можно получать способами рекомбинантных ДНК (патент США № 4816567).

В гибридном способе мышь или другое соответствующее животное-хозяина, такое как хомяк, иммунизируют для получения лимфоцитов, которые вырабатывают или которые способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации. Индуцирование антител к OX40L, как правило, осуществляют у животных множественными подкожными (sc) или внутривенными (ip) инъекциями OX40L и адьюванта. OX40L можно получать с использованием способов, хорошо известных в данной области, некоторые из которых далее здесь описаны. Например, рекомбинантная продукция OX40L описана

ниже. В одном из вариантов осуществления животных иммунизируют производным OX40L, которое содержит внеклеточный домен (ECD) OX40L, слитый с частью Fc тяжелой цепи иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления животных иммунизируют слитым белком OX40L-IgG1. Животных вначале иммунизируют иммуногенными конъюгатами или производными OX40L на основе монофосфорил-липидов A (MPL)/дикрономиколата трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) и раствор инъецируют интрадермально во многих участках. Две недели спустя животным проводят повторную иммунизацию. 7-14 суток спустя у животных отбирают кровь и сыворотку анализируют на титр к OX40L. Животным проводят повторную иммунизацию до тех пор, пока титр не стабилизируется.

Альтернативно лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем производят слияние лимфоцитов с миеломными клетками с использованием подходящего вещества, вызывающего слияние, такого как полиэтиленгликоль, для получения гибридных клеток (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Таким образом полученные гибридные клетки высевают в подходящую культуральную среду и выращивают в ней, где среда предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неподвергшихся слиянию родительских миеломных клеток. Например, если у родительских миеломных клеток отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), вещества, которые предотвращают рост Т-клеток с дефектом HGPRT.

Предпочтительные миеломные клетки представляют собой клетки, которые эффективно подвергаются слиянию, поддерживают стабильную выработку антител на высоком уровне селективированными продуцирующими антитела клетками и являются чувствительными к среде, такой как среда HAT. Среди них предпочтительными миеломными линиями клеток являются мышинные миеломные линии, такие как линии, происходящие из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступных в Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клеток SP-2 или X63-Ag8-653, доступных в American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также описаны относительно получения человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают гибридные клетки, анализируют относительно выработки моноклональных антител, направленных против OX40L. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых гибридными клетками, определяют иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA).

Аффинность связывания моноклональных антител, например, можно определить с помощью анализа Скэтчарда по Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации тех гибридных клеток, которые вырабатывают антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать посредством способов серийных разведений и выращивать с помощью общепринятых способов (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*,

pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие культуральные среды для этой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей в животном.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом выделяют из культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки с помощью общепринятых способов очистки иммуноглобулинов, таких как, например, протеин-А-сефароза, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Антитела к ОХ40L по изобретению можно получать с использованием комбинаторных библиотек для скрининга на клоны синтетических антител с требуемой активностью или активностями. По существу, клоны синтетических антител отбирают с помощью скрининга фаговых библиотек, содержащих фаг, на котором экспонированы различные фрагменты варибельной области (Fv) антител, слитой с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки отбирают аффинной хроматографией относительно требуемого антигена. Клоны, экспрессирующие Fv-фрагменты, способные связываться с требуемым антигеном, адсорбируются на антиген и таким образом отделяются от несвязавшихся клонов в библиотеке.

Связавшиеся клоны затем элюируют с антигена, и их можно далее обогащать с помощью дополнительных циклов адсорбции на антигене/элюции с него. Любые из антител к ОХ40L по изобретению можно получать путем разработки подходящего способа скрининга с использованием антигена для селекции представляющего интерес фагового клона с последующим получением клона полноразмерных антител к ОХ40L с использованием Fv-последовательностей из представляющего интерес фагового клона и последовательностей подходящей константной области (Fc), описанных у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Антигенсвязывающий домен антител образован двумя варибельными (V) областями приблизительно из 110 аминокислот, по одной области из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, которые обе дают три гиперварибельные петли или области, определяющие комплементарность (CDR). Варибельные домены можно функционально экспонировать на фаге, или в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), в которых VH и VL ковалентно связаны посредством короткого, гибкого пептида, или в виде Fab-фрагментов, в которых каждый из них слит с константным доменом, и они взаимодействуют нековалентно, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Как используют в настоящем описании, фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, собирательно обозначают как «фаговые Fv-клоны» или «Fv-клоны».

Репертуары генов VH и VL можно по отдельности клонировать с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) и случайным образом рекомбинировать в фаговых библиотеках, в которых затем можно осуществлять поиск антигенсвязывающих клонов, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Библиотеки из иммунизированных источников дают высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости создания гибридом. Альтернативно «наивный» репертуар можно клонировать для создания единого источника антител человека к широкому диапазону неауто-, а также аутоантигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). В заключение не подвергнутые воздействию библиотеки можно также получать синтетически клонированием неперестроенных сегментов V-генов из стволовых клеток и с

использованием праймеров для PCR, содержащих случайную последовательность для кодирования высоковариабельных областей CDR3 и для осуществления перестройки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

Нитевидный фаг применяют для экспонирования фрагментов антител посредством слияния с минорным белком оболочки рIII. Фрагменты антител можно экспонировать в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых VH- и VL-домены связаны на одной полипептидной цепи гибким полипептидным спейсером, например, как описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), или в виде Fab-фрагментов, в которых одну цепь подвергают слиянию с рIII и другая секретируется в периплазму бактериальной клетки-хозяина, где происходит сборка структуры Fab-белок оболочки, которая начинает экспонироваться на поверхности фага путем замещения некоторых белков оболочки дикого типа, например, как описано в Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19:4133-4137 (1991).

Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты генов антител, получают из иммунных клеток, выделенных из человека или животных. Если требуется библиотека, обогащенная клонами против OX40L, то субъект иммунизируют посредством OX40L для получения гуморального иммунного ответа, и клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки из других периферических лимфоцитов крови (PBL) выделяют для создания библиотеки. В предпочтительном варианте осуществления библиотеку фрагментов гена антител человека, обогащенную клонами против OX40L человека, получают вызыванием гуморального иммунного ответа по отношению к OX40L человека у трансгенных мышей, несущих функциональный набор генов иммуноглобулинов человека (и лишенных функциональной системы выработки эндогенных антител) таким образом, что иммунизация OX40L приводит к выработке В-клетками человеческих антител к OX40L.

Получение трансгенных мышей, вырабатывающих человеческие антитела, описано ниже.

Дополнительное обогащение популяциями активированных клеток против OX40L можно получать с использованием подходящего способа скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих специфичные к OX40L мембраносвязанные антитела, например, путем отделения клеток аффинной хроматографией с OX40L или адсорбцией клеток к меченному флуорохромом OX40L с последующим флуоресцентно-активированным клеточным сортированием (FACS).

Альтернативно использование клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL из неиммунизированного донора дает лучшее представление возможного репертуара антител, а также позволяет создание библиотеки антител с использованием любого вида животного (человека или не являющегося человеком), в котором OX40L не является антигенным. Для библиотек, включающих конструирование генов антител *in vitro*, стволовые клетки выделяют из субъекта для получения нуклеиновых кислот, кодирующих неперестроенные сегменты генов антител. Представляющие интерес иммунные клетки можно получать из множества видов животных, таких как виды человека, мыши, крысы, зайцеобразных, кроличьих, собачьих, кошачьих, свиней, бычьих, лошадиных и птиц, и т.п.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую ген вариабельных сегментов антител (включая VH- и VL-сегменты), выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае библиотек перестроенных VH- и VL-генов требуемую ДНК можно получать выделением геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей

полимеразной цепной реакцией (PCR) с праймеров, комплементарных 5'- и 3'-концам перестроенных VH- и VL-генов, как описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), таким образом создавая разнообразные репертуары V-генов для экспрессии. V-гены можно амплифицировать, исходя из кДНК и геномной ДНК с обратными праймерами на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямыми праймерами, расположенными в пределах J-сегмента, как описано в Orlandi et al. (1989) и в Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Однако для амплификации с кДНК обратные праймеры можно также располагать в лидерном экзоне, как описано в Jones et al., Biotechnol., 9:88-89 (1991), и прямые праймеры в пределах константной области, как описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Для максимизации комплементарности в праймеры можно включить вырожденность, как описано в Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). Предпочтительно разнообразие библиотеки максимизируют с использованием праймеров для PCR, нацеленных на каждое семейство V-генов, для того, чтобы амплифицировать все доступные VH- и VL-конфигурации, присутствующие в образце нуклеиновой кислоты из иммунных клеток, например, как описано в способе по Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) или как описано в способе по Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующие векторы можно вводить редкие участки рестрикции в праймер для PCR в виде метки на один конец, как описано в Orlandi et al. (1989), или дополнительной амплификацией посредством PCR с меченого праймера, как описано в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

Репертуары синтетически перестроенных V-генов можно получать *in vitro*, исходя из сегментов V-генов. Большинство сегментов VH-генов человека клонировано и секвенировано (сообщено в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)), и картировано (сообщено в Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993)); эти клонированные сегменты (включая все мажорные конформации H1- и H2-петли) можно использовать для получения различных репертуаров VH-генов с праймеров для PCR, кодирующих H3-петли разной последовательности и длины, как описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). VH-репертуары можно также получать во всем разнообразии последовательности, сосредоточенном в длинной H3-петле одной длины, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). Сегменты V_κ и V_λ человека клонированы и секвенированы (сообщено в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)), и их можно использовать для получения репертуаров синтетической легкой цепи. Репертуары синтетического V-гена на основе диапазона VH- и VL-изгибов, и L3- и H3-длин кодируют антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации ДНК, кодирующих V-ген, сегменты V-генов зародышевой линии можно перестраивать *in vitro* согласно способам по Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

Репертуары фрагментов антител можно конструировать сочетанием вместе репертуаров VH- и VL-генов несколькими способами. Каждый репертуар можно получать в разных векторах, и вектора рекомбинируют *in vitro*, например, как описано в Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993), или *in vivo* сочетанной инфекцией, например, посредством системы loxP, описанной в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993). В способе рекомбинации *in vivo* используют двухцепочечную природу Fab-фрагментов для преодоления ограничения размера библиотеки, на который накладывает ограничение эффективность трансформации *E. coli*. «Наивные» VH- и VL-репертуары клонируют по отдельности, один в фагмидный и другой в фаговый вектор. Две библиотеки затем комбинируют путем фаговой инфекции содержащих

фагмиду бактерий таким образом, что каждая клетка содержит разное сочетание, и размер библиотеки ограничен только количеством присутствующих клеток (приблизительно 10^{12} клонов). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo* таким образом, что VH- и VL-гены рекомбинируют в единый репликон и совместно упаковываются в фаговые вирионы. Эти гигантские библиотеки дают большие количества различных антител с хорошей аффинностью (K_d^{-1} приблизительно 10^{-8} М).

Альтернативно репертуары можно клонировать последовательно в тот же самый вектор, например, как описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), или собирать вместе с помощью PCR и затем клонировать, например, как описано в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Сборку с помощью PCR можно также использовать для соединения ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер, для образования репертуаров одноцепочечных Fv (scFv). В другом способе «сборку с помощью PCR в клетке» используют для объединения VH- и VL-генов в лимфоцитах с помощью PCR и затем клонирования репертуаров соединенных генов, как описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992).

Антитела, образуемые «наивными» библиотеками (или природными или синтетическими), могут обладать умеренной аффинностью (K_d^{-1} приблизительно от 10^6 до 10^7 М⁻¹), но аффинное созревание можно также имитировать *in vitro* конструированием и повторной селекцией, исходя из вторичных библиотек, как описано в Winter et al. (1994), выше. Например, мутацию можно случайно вводить *in vitro* с использованием неточной полимеразы (сообщено в Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)) в способе по Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) или в способе по Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992). Кроме того, аффинное созревание можно осуществлять случайным мутагенезом одной или нескольких CDR, например, с использованием PCR с праймеров, несущих случайную последовательность, охватывающую представляющую интерес CDR, в отобранных индивидуальных Fv-клонах, и скринингом на клоны с более высокой аффинностью. В WO 9607754 (опубликован 14 марта 1996) описан способ индуцирования мутагенеза в определяющей комплементарности области легкой цепи иммуноглобулина для получения библиотеки генов легких цепей. Другой эффективный способ представляет собой рекомбинацию VH- или VL-доменов, отобранных при помощи фагового дисплея, с репертуарами встречающихся в природе вариантов V-домена, полученных от неиммунизированных доноров, и скрининг на более высокую аффинность в нескольких циклах перестройки цепи, как описано в Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Этот способ позволяет получать антитела и фрагменты антител с аффинностями в диапазоне 10^{-9} М.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую OX40L, можно сконструировать с использованием аминокислотной последовательности требуемой области OX40L, например, внеклеточного домена. Альтернативно можно использовать последовательность кДНК (или ее фрагменты). Дополнительные последовательности OX40L далее описаны, например, в SwissProt, инвентарный номер P23510. ДНК, кодирующие OX40L, можно получать множеством способов, известных в данной области. Эти способы включают в качестве неограничивающих примеров химический синтез с помощью любых из способов, описанных в Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734 (1989), таких как способы на основе триэфира, фосфита, фосфорамидита и Н-фосфоната. В одном из вариантов осуществления при конструировании ДНК, кодирующей OX40L, используют кодоны,

предпочтительные при экспрессии в клетке-хозяине. Альтернативно ДНК, кодирующую OX40L, можно выделять из геномной библиотеки или библиотеки кДНК.

После конструирования молекулы ДНК, кодирующей OX40L, молекулу ДНК функционально связывают с управляющей экспрессией последовательностью в экспрессирующем векторе, таком как плаزمид, где управляющая последовательность узнается клеткой-хозяином, трансформированной вектором. Как правило, плазмидные векторы содержат реплицирующие и управляющие последовательности, которые происходят из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектор исходно несет реплицирующий участок, а также последовательности, которые кодируют белки, которые способны обеспечить селекцию по фенотипу в трансформированных клетках. Подходящие векторы для экспрессии в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах известны в данной области, и некоторые из них далее здесь описаны. Можно использовать эукариотические организмы, такие как дрожжи, или клетки, полученные из многоклеточных организмов, таких как млекопитающие.

Необязательно, ДНК, кодирующая OX40L, функционально связана с секреторной лидерной последовательностью, что приводит к секреции продукта экспрессии клеткой-хозяином в культуральную среду. Примеры секреторных лидерных последовательностей включают stII, экотин, lamB, GD герпеса, lpp, щелочную фосфатазу, инвертазу и альфа-фактор. Также для использования в настоящем описании подходит 36-аминокислотная лидерная последовательность белка A (Abrahmsen et al., EMBO J., 4:3901 (1985)).

Клетки-хозяева трансфицируют и предпочтительно трансформируют вышеописанными экспрессирующими или клонирующими векторами по данному изобретению, и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

Трансфекция обозначает захват экспрессирующего вектора клеткой-хозяином, при этом любые кодирующие последовательности фактически или экспрессируются, или нет. Обычному специалисту известны многочисленные способы трансфекции, например преципитация с помощью CaPO_4 и электропорация. Успешную трансфекцию, как правило, определяют, когда любой признак функционирования этого вектора находится в клетке-хозяине. Способы трансфекции хорошо известны в данной области, и некоторые из них далее здесь описаны.

Трансформация означает введение ДНК в организм таким образом, что ДНК реплицируется или в качестве внехромосомного элемента, или в качестве вставки в хромосому. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с использованием общепринятых способов, подходящих для таких клеток. Способы трансформации хорошо известны в данной области, и некоторые из них далее здесь описаны.

Прокариотические клетки-хозяева, используемые для получения OX40L, можно культивировать, как описано в общих чертах в Sambrook et al., выше.

Клетки-хозяева млекопитающих, используемые для получения OX40L, можно культивировать во множестве сред, которые хорошо известны в данной области, и некоторые из которых здесь описаны.

Клетки-хозяева, к которым относится данное описание, включают клетки для культивирования *in vitro*, а также клетки, которые находятся внутри животного-хозяина.

Очистку OX40L можно осуществлять с использованием способов, известных в данной области.

Очищенный OX40L можно присоединить к подходящей матрице, такой как агарозные бусы, акриламидные бусы, стеклянные бусы, целлюлоза, различные акриловые сополимеры, гели гидроксилметакрилата, полиакриловые и полиметакриловые сополимеры, нейлон, нейтральные и ионные носители и т.п., для использования в разделении клонов фагового дисплея аффинной хроматографией. Присоединение белка OX40L к матрице можно осуществлять способами, описанными в *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Общепринятый способ присоединения белковых лигандов к полисахаридным матрицам, например агарозе, декстрану или целлюлозе, включает активацию носителя циангалогенидами и последующее связывание первичных алифатических или ароматических аминов пептидного лиганда с активированной матрицей.

Альтернативно OX40L можно использовать для покрытия лунок адсорбционных планшетов, экспрессировать на клетках-хозяевах, прикрепленных к адсорбционным планшетам, или использовать в клеточном сортинге, или конъюгировать с биотином для улавливания покрытых стрептавидином бус, или использовать в любом другом способе, известном в данной области, для пэннинга библиотек фагового дисплея.

Образцы фаговой библиотеки контактируют с иммобилизованным OX40L в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, части частиц фага с адсорбентом. Обычно условия, включая pH, ионную силу, температуру и т.п., подбирают, чтобы имитировать физиологические условия. Фаги, связанные с твердой фазой, промывают и затем элюируют кислотой, например, как описано в Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), или конкуренцией с антигеном OX40L, например, в способе, сходном со способом конкуренции с антигеном в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). Фаги можно обогащать в 20-1000 раз в одном цикле селекции. Более того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и подвергать дальнейшим циклам селекции.

Эффективность селекции зависит от многих факторов, включая кинетику диссоциации в ходе отмывки, и от того, могут ли множественные фрагменты антител на одном фаге одновременно контактировать с антигеном. Антитела быстрой кинетикой диссоциации (и низкими аффинностями связывания) можно удерживать при использовании коротких отмывок, поливалентного фагового дисплея и высокой плотности покрытия антигеном твердой фазы. Высокая плотность не только стабилизирует фаг посредством поливалентных взаимодействий, но способствует повторному связыванию диссоциировавшего фага. Селекцию антител с медленной кинетикой диссоциации (и хорошими аффинностями связывания) можно облегчать использованием длительных отмывок и моновалентного фагового дисплея, как описано в Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990) и в WO 92/09690, и низкой плотности покрытия антигеном, как описано в Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992).

Возможно осуществление селекции на OX40L между фаговыми антителами разных аффинностей, даже аффинностей, которые незначительно различаются. Однако случайная мутация селектируемых антител (например, в ходе осуществления некоторых способов аффинного созревания, описанных выше), вероятно, приведет к образованию многих мутантов, более всего связывающихся с антигеном, и немногих с более высокой аффинностью. При ограниченном количестве OX40L немногочисленные фаги с высокой аффинностью могут отсеиваться. Для сохранения

всех мутантов с более высокой аффинностью фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного ОХ40L, но с биотинилированным ОХ40L в концентрации более низкой молярности, чем планируемое значение молярной константы сродства с ОХ40L.

Фаги с высокой аффинностью связывания можно затем улавливать на покрытых стрептавидином парамагнитных бусах. Такое «равновесное улавливание» дает возможность селектировать антитела согласно их аффинности связывания с чувствительностью, которая позволяет выделять мутантные клоны с до двух раз более высокой аффинностью из большого избытка фагов с более низкой аффинностью.

Используемыми условиями отмывки фагов, связанных с твердой фазой, также можно манипулировать для разделения на основе кинетики диссоциации.

Клоны анти-ОХ40L можно селектировать по активности. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителам к ОХ40L, которые блокируют связывание между рецептором ОХ40 и ОХ40L, но не блокируют связывание между рецептором ОХ40 и вторым белком. Fv-клоны, соответствующие таким антителам к ОХ40L, можно селектировать (1) выделением клонов анти-ОХ40L из фаговой библиотеки, как описано выше, и необязательно амплификацией выделенной популяции фаговых клонов путем выращивания популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) выбором ОХ40L и второго белка, по отношению к которым, соответственно, требуется блокирование и неблокирование активности; (3) адсорбцией фаговых клонов анти-ОХ40L на иммобилизованном ОХ40L; (4) использованием избытка второго белка для элюции любых нежелательных клонов, которые распознают детерминанты связывания ОХ40L, которые перекрываются с детерминантами связывания второго белка или совпадают с ними; и (5) элюцией клонов, которые остаются адсорбированными в ходе стадии (4). Необязательно клоны с требуемыми свойствами блокирования/неблокирования можно далее обогатить повторением описанных здесь процедур селекции один или несколько раз.

ДНК, кодирующую полученную из гибридом моноклональные антитела или Fv-клоны фагового дисплея по изобретению, легко выделяют и секвенируют с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных праймеров, сконструированных для специфической амплификации представляющих интерес областей, кодирующих тяжелую и легкую цепи, с гибридной или фаговой матричной ДНК). После выделения ДНК можно встроить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или миеломные клетки, которые не вырабатывают другой белок-иммуноглобулин, для осуществления синтеза требуемых моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитела, включают Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992).

ДНК, кодирующую Fv-клоны по изобретению, можно объединять с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные области тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, подходящие последовательности ДНК можно получать от Kabat et al., выше), для получения клонов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи полной или частичной длины. Будет принято во внимание, что можно использовать для этой цели константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать из любого вида человека или животного. Как используют в настоящем описании, Fv-клон, происходящий из вариабельного домена ДНК одного вида животного (такого

как человек) и затем слитый с константной областью ДНК другого вида животного с образованием последовательности(ей), кодирующей(их) «гибридную», полноразмерную тяжелую цепь и/или легкую цепей, включают в определение «химерных» и «гибридных» антител. В предпочтительном варианте осуществления Fv-клон, происходящий из вариабельной ДНК человека, подвергают слиянию с константной областью ДНК человека с образованием кодирующей(их) последовательности(ей) для всех тяжелых и/или легких цепей человека полной или частичной длины.

ДНК, кодирующую антитела к OX40L, происходящую из гибридомы по изобретению, можно также модифицировать, например, замещением последовательности, кодирующей константные домены тяжелой и легкой цепи человека, вместо гомологичных мышинных последовательностей, происходящих из клона гибридомы (например, как в способе Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующую антитела или фрагмент, происходящие из гибридомы или Fv-клона, можно далее модифицировать ковалентным присоединением к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, всей или части последовательности, кодирующей полипептид, не являющийся иммуноглобулином. Таким образом, получают «химерные» или «гибридные» антитела, которые обладают специфичностью связывания антител по изобретению, происходящих из Fv-клона или клона гибридомы.

Фрагменты антител

Настоящее изобретение относится к фрагментам антител. В определенных условиях существуют преимущества использования фрагментов антител вместо целых антител. Меньший размер фрагментов обеспечивает быстрый клиренс и может вести к улучшению доступа к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы.

Традиционно эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (смотри, например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Все Fab-, Fv- и ScFv-фрагменты антител можно экспрессировать в *E. coli*, и они могут секретироваться из *E. coli*, обеспечивая таким образом легкое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, рассмотренных выше. Альтернативно фрагменты Fab'-SH можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически соединять с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа, связывающего рецептор спасения, описаны в патенте США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны квалифицированному специалисту. В других вариантах осуществления предпочтительное для выбора антитела представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). Смотри WO 93/16185, патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Fv и sFv представляют собой единственные типы с интактными активными центрами, которые лишены константных областей; таким образом, они пригодны для снижения неспецифического связывания при применении *in vivo*. Слитые белки sFv можно сконструировать с получением эффекторного белка, слитого или с N-концом, или с C-концом sFv. Смотри Antibody Engineering, ed.

Borrebaeck, выше. Также фрагмент антитела может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

Гуманизированные антитела

5 Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам. Разнообразные способы гуманизации антител, не являющихся человеческими, известны в данной области. Например, гуманизированное антитело может обладать одним или
10 несколькими аминокислотными остатками, встроенными в него из источника, который не является человеческим. Такие не являющиеся человеческими аминокислотные остатки часто называют «импортными» остатками, которые, как правило, взяты из «импортного» вариабельного домена. Гуманизацию главным образом можно проводить в соответствии со способом Winter и коллег (Jones et al.,
15 Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), посредством замены соответствующих последовательностей антитела человека последовательностями гипервариабельных областей. Таким образом, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), где, по существу, менее интактного
20 вариабельного домена человека замещено соответствующей последовательностью вида, не относящегося к человеку. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

25 Выбор вариабельных доменов человека, как легких, так и тяжелых цепей, для использования при получении гуманизированных антител является очень важным для снижения антигенности. В соответствии с так называемым способом «наилучшего соответствия» последовательность вариабельного домена антитела грызуна
30 анализируют относительно целой библиотеки известных последовательностей вариабельных доменов человека. Затем последовательность человека, которая является наиболее сходной с последовательностью грызуна, считают приемлемой в качестве каркасной области человека для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе
35 используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:4285
40 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Более того, важно, чтобы антитела были гуманизированными с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других положительных биологических свойств. Для достижения этой цели согласно одному способу гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа родительских последовательностей и
45 различных предполагаемых гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются широко доступными и известны специалистам в данной области. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и выводят на экран возможные трехмерные
50 конформационные структуры выбранных предполагаемых последовательностей иммуноглобулинов. Исследование этих выведенных на экран данных позволяет проводить анализ возможной роли остатков в функционировании предполагаемых

последовательностей иммуноглобулинов, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность предполагаемого иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR можно отбирать и комбинировать из реципиентной и импортированной последовательностей таким образом, чтобы добиться требуемых свойств антител, таких как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени(ям). Как правило, непосредственное и наиболее значительное влияние на связывание антигена оказывают остатки гипервариабельной области.

Человеческие антитела

Человеческие антитела к OX40L по изобретению можно получать сочетанием последовательности(ей) вариабельного домена Fv-клона, отобранных из библиотек фагового дисплея, происходящих из человека, с известной(ыми) последовательностью(ями) константного домена человека, как описано выше. Альтернативно человеческие моноклональные антитела к OX40L по изобретению можно получать гибридным способом. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител описаны, например, в Kozbor. J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991).

В настоящее время возможно получение трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации способны продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области соединения тяжелых цепей антител (J_H) у химерных и несущих мутации в зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антител. Перенос системы генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким несущим мутации в зародышевой линии мышам при антигенной стимуляции будет приводить к продукции антител человека. См. например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993).

Для получения антител человека из не принадлежащих человеку антител, например антител грызунов, где антитела человека обладают сходными аффинностями и специфичностями по отношению к исходным, не принадлежащим человеку антителам, также можно использовать перестановку генов. Согласно этому способу, который также называют «эпитопным импринтингом», вариабельную область или тяжелой или легкой цепи не принадлежащего человеку фрагмента антител, которые получают способами фагового дисплея, как описано выше, замещают репертуаром генов V-домена человека, получая популяцию химерных молекул scFv или Fab, состоящих из не принадлежащих человеку/принадлежащих человеку цепей. Отбор по отношению к антигену приводит к выделению химерных молекул scFv или Fab, состоящих из не принадлежащих человеку/принадлежащих человеку цепей, где в цепи человека восстанавливается антигенсвязывающий участок, нарушенный при удалении соответствующей не принадлежащей человеку цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп обуславливает (фиксирует) выбор партнера цепи человека. Антитела человека получают при повторении процесса замещения остающейся, не принадлежащей человеку цепи (смотри PCT WO 93/06213, опубликованный 1 апреля 1993). В отличие от традиционной гуманизации не принадлежащих человеку антител привитием CDR этот способ приводит к получению полностью человеческих антител, которые не содержат остатки FR или CDR не связанного с человеком

происхождения.

Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные, предпочтительно человеческие или гуманизированные антитела, которые обладают специфичностями связывания в отношении, по меньшей мере, двух разных антигенов. В настоящем случае одна из специфичностей связывания относится к ОХ40L, и другая относится к любому другому антигену. Типичные биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами белка ОХ40L. Биспецифические антитела можно также использовать для направленной доставки цитотоксических средств к клеткам, которые экспрессируют ОХ40L. Эти антитела обладают частью для связывания с ОХ40L и частью, которая связывается с цитотоксическим средством (например, сапорином, анти-интерфероном α , алкалоидом барвинка, А-цепью рицина, метотрексатом или гаптенем с радиоактивным изотопом). Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')₂).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционно рекомбинантное получение биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулинов, где две тяжелые цепи обладают различными специфичностями (Milstein and Cuellar, Nature, 305: 537 (1983)). Вследствие случайной сборки тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов такие гибридомы (квадромы) продуцируют смесь потенциально из 10 разных молекул антител, из которых только одна обладает правильной биспецифической структурой. Очистка правильных молекул, которую обычно осуществляют посредством стадий аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, и выход продукта является низким. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 г., и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991).

В соответствии с другим и более предпочтительным подходом проводят слияние переменных доменов антител с требуемыми специфичностями связывания (участками связывания антитело-антиген) с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние предпочтительно проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим, по меньшей мере, часть шарнирных областей СН2 и СН3. Предпочтительно, чтобы первая константная область тяжелой цепи (СН1), содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовала, по меньшей мере, в одном из компонентов, предназначенных для слияния. Молекулы ДНК, кодирующие предназначенные для слияния компоненты тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если требуется, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и осуществляют совместную трансфекцию ими пригодного организма-хозяина. Это встраивание обеспечивает значительную гибкость регулирования взаимных соотношений трех полипептидных фрагментов в вариантах осуществления, где неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальный выход продукта. Однако возможно встраивание кодирующих последовательностей двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия, по меньшей мере, двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу продукта или если соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с одной

специфичностью связывания в одной части и пары тяжелая цепь-легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обладающей другой специфичностью связывания) в другой части. Обнаружено, что такая асимметричная структура облегчает разделение требуемого биспецифического соединения и нежелательных сочетаний цепей иммуноглобулинов, поскольку наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот способ описан в WO 94/04690. Для более подробного описания получения биспецифических антител смотри, например, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Согласно другому способу можно сконструировать область контакта между парой молекул антител для максимального увеличения процентной доли гетеродимеров, которые выделяют из рекомбинантной клеточной культуры. Предпочтительная область контакта содержит, по меньшей мере, часть C_H3-домена константного домена антител. В этом способе одну или несколько небольших аминокислотных боковых цепей из области контакта первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). В области контакта второй молекулы антитела создают компенсирующие «полости» идентичного или сходного с крупной(ыми) боковой(ыми) цепью(ями) размера посредством замены крупных аминокислотных боковых цепей цепями меньших размеров (например, аланином или треонином). Эта замена обеспечивает механизм для повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают поперечно сшитые антитела или «гетероконъюгаты» антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате можно соединить с авидином, а другое - с биотином. Такие антитела, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы против нежелательных клеток (патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/00373 и EP 03089).

Гетероконъюгаты антител можно получать с использованием любых пригодных способов поперечного сшивания. Пригодные вещества для поперечного сшивания хорошо известны в данной области и описаны в патенте США № 4676980 совместно с рядом способов поперечного сшивания.

Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием образования химических связей. В Brennan et al., Science, 229:81 (1985) описан способ, в котором интактные антитела протеолитически расщепляют с получением F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии арсенита натрия, вещества, образующего комплексы с дитиолами, для стабилизации соседних дитиолов и предотвращения образования межмолекулярного дисульфида. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из производных Fab'-TNB повторно превращают в Fab'-тиол восстановлением меркаптоэтиламина и смешивают с эквимоллярным количеством другого производного Fab'-TNB с получением биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Последние достижения упростили прямое выделение из *E. coli* фрагментов Fab'-SH, которые можно химически соединять с образованием биспецифических антител. В Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) описано получение полностью гуманизированной молекулы F(ab')₂ биспецифического антитела. Осуществляли

секрецию из *E. coli* каждого Fab'-фрагмента по отдельности и их подвергали прямому химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела.

Биспецифическое антитело, полученное таким образом, обладало способностью связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против мишеней при раке молочной железы человека.

Также описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры.

Например, получены биспецифические антитела с использованием «лейциновых молний», Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды «лейциновой молнии» из белков Fos и Jun соединяли с Fab'-частями двух различных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области с образованием мономеров и затем повторно окисляли с образованием гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Способ «димерных антител», описанный в Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), предусматривает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) посредством линкера, который является слишком коротким для возможности образования пары между двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, таким образом формируя два антигенсвязывающих участка. Также описан другой способ получения фрагментов биспецифических антител с использованием димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Также предусмотрены антитела более чем с двумя валентностями. Например, можно получать триспецифические антитела, Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991).

Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может быть быстрее, чем бивалентное антитело, интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которой связываются антитела. Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой поливалентные антитела (которые являются отличными от класса IgM) с тремя антигенсвязывающими участками или более (например, тетравалентные антитела), которые можно легко получать посредством рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антител. Поливалентные антитела могут содержать димеризационный домен и три или более антигенсвязывающих участка. Предпочтительный димеризационный домен содержит (или состоит из) Fc-область или шарнирную область. В этом случае антитело содержит Fc-область и три или более антигенсвязывающих участка со стороны N-конца Fc-области. Предпочтительное в настоящем описании поливалентное антитело содержит (или состоит из) от трех до приблизительно восьми, однако предпочтительно четыре, антигенсвязывающих участка. Поливалентное антитело содержит, по меньшей мере, одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), где полипептидная(ые) цепь(и) содержит(ат) два или более переменных домена. Например, полипептидная(ые) цепь(и) может(могут) содержать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или

полипептид, и n представляет собой 0 или 1. Например, полипептидная(ые) цепь(и) может(могут) содержать: цепь VH-CH1-гибкий линкер-VH-CH1-Fc-область; или цепь VH-CH1-VH-CH1-Fc-область. В настоящем описании поливалентное антитело предпочтительно дополнительно содержит, по меньшей мере, два (и предпочтительно 5 четыре) полипептида переменных доменов легкой цепи. В настоящем описании поливалентное антитело, например, может содержать приблизительно от двух до приблизительно восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Полипептиды переменного домена легкой цепи, предусмотренные в настоящем 10 описании, содержат переменный домен легкой цепи и необязательно дополнительно содержат домен CL.

Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления предусмотрена(ы) модификация(и) аминокислотных последовательностей описанных в данной работе антител.

15 Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антител. Варианты аминокислотных последовательностей антител получают посредством внесения соответствующих нуклеотидных замен в нуклеиновую кислоту антитела или посредством пептидного синтеза. Такие 20 модификации включают, например, делеции остатков, и/или вставки остатков, и/или замены остатков аминокислотной последовательности антител. Для получения конечной конструкции осуществляют любое сочетание из делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми свойствами. Модификации аминокислот можно вносить в рассматриваемую аминокислотную 25 последовательность антител во время получения последовательности.

Пригодный способ выявления определенных остатков или областей антител, которые являются предпочтительными участками для мутагенеза, называют «сканирующим аланином мутагенезом», как описано в Cunningham and Wells (1989) 30 Science, 244:1081-1085. В данной работе выявляют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), чтобы влиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те положения аминокислот, которые проявляют 35 функциональную чувствительность к замещениям, затем корректируют посредством введения дополнительных или других вариантов в участки замещения или вместо них. Таким образом, несмотря на то что участок для внесения изменения в аминокислотную последовательность является predetermined, нет необходимости 40 в непосредственной predeterminedности характера мутации. Например, для анализа действия мутации в данном участке в кодоне-мишени или области-мишени проводят сканирование аланином или случайный мутагенез и для экспрессированных иммуноглобулинов проводят скрининг на наличие требуемой активности.

Вставки аминокислотных последовательностей включают предназначенные для 45 слияния на N- и/или C-конце последовательности, обладающие длиной, находящейся в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также вставки внутрь последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитела с N- 50 концевым остатком метионина или антитела, слитые с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты вставок в молекулу антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который повышает время полужизни антитела в сыворотке.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный характер гликозилирования антитела. Такое изменение включает удаление одной или нескольких углеводных групп, находящихся на антителе, и/или добавление одного или нескольких участков гликозилирования, которые не присутствуют в антителе.

Гликозилирование полипептидов, как правило, представляет собой или N-гликозилирование или O-гликозилирование. N-гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности, распознаваемые для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, наличие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, представляющих собой N-ацетилгалактозамин, галактозу или ксилозу, к гидроксикаминокислоте, как правило, к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Участки гликозилирования удобно добавлять в антитело посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из описанных выше трипептидных последовательностей (в случае участков N-гликозилирования). Также изменение можно осуществлять добавлением одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела или заменой на один или несколько остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (в случае участков O-гликозилирования).

В том случае, если антитела содержат Fc-область, можно изменить присоединенный к ней углевод. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc-области антител, описаны в патентной заявке США № US 2003/0157108 (Presta, L.). Смотри также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела, содержащие разделяющий N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-области антител, рассмотрены в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al., и патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела, обладающие, по меньшей мере, одним остатком галактозы в олигосахаридах, присоединенном к Fc-области антител, рассмотрены в WO 1997/30087, Patel et al. Смотри также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.) относительно антител с измененным углеводом, присоединенным к Fc-области антител. Смотри также US 2005/0123546 (Umana et al.) относительно антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

В данной работе предпочтительный вариант гликозилирования содержит Fc-область, где в углеводной структуре, присоединенной к Fc-области, отсутствует фукоза. Такие варианты обладают улучшенной функцией в отношении ADCC. Необязательно Fc-область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые еще более улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков Eu). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «лишенным фукозы» антителам, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Примеры линий клеток, продуцирующих

дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, у которых нарушено фукозилирование белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в особенности в примере 11), и нокаутные линии клеток, такие как нокаутные
5 клетки CHO по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8* (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)).

Другим типом варианта является вариант с заменой аминокислоты. Такие варианты обладают, по меньшей мере, одним остатком аминокислоты в молекуле
10 антитела, который заменен другим остатком. Участки, представляющие наибольший интерес для проведения мутагенеза с заменой, включают гипервариабельные участки, но также предполагаются изменения FR. Консервативные замены представлены в таблице 1 под заголовком «предпочтительные замены». Если результатом таких замен является изменение биологической активности, тогда можно вносить более
15 значительные изменения, обозначенные в таблице 1 как «иллюстративные замены», или как описано ниже в отношении классов аминокислот, и проводить скрининг продуктов.

Таблица 1

	Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
5	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
10	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
15	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
20	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
	Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
25	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
30	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
35	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

40 Существенные модификации биологических свойств антител проводят, выбирая замены, которые значительно различаются по их эффекту на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, такого как конформация в виде слоя или спирали, (б) заряда или гидрофобности молекулы в участке-мишени, или (с) размера боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки

45 объединяют в группы на основе сходства типичных свойств их боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr, asn, gln;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: his, lys, arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на член

из другого класса.

Один из типов варианта с заменой включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный(ые) вариант(ы), отобранный(ые) для дальнейшей разработки, обладает(ют) улучшенными биологическими свойствами относительно родительского антитела, из которого он(они) получен(ы). Удобный способ получения таких вариантов с заменами включает аффинное созревание с использованием фагового дисплея. В кратком изложении, в несколько участков гипервариабельной области (например, в 6-7 участков) вносят мутации для получения всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Антитела, полученные таким образом, продуцируют в частицах нитевидных фагов в качестве антител, слитых с продуктом гена III M13, упакованных в каждой частице. Затем проводят скрининг продуцированных в фагах вариантов на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в настоящем описании. В целях выявления участков гипервариабельной области, являющихся кандидатами для модификации, можно проводить сканирующий аланином мутагенез для выявления остатков гипервариабельной области, в значительной степени участвующих в связывании антигена. Альтернативно или дополнительно может быть целесообразным проведение анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для определения участков контакта между антителом и антигеном. Такие формирующие контакт остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии с разработанными в настоящем описании способами. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, как описано в настоящем описании, и для дальнейшей разработки можно отбирать антитела с наилучшими свойствами посредством одного или нескольких пригодных способов анализа.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антител, получают множеством способов, известных в данной области. Эти способы включают в качестве неограничивающих примеров выделение из природного источника (в случае вариантов встречающейся в природе аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-специфического) мутагенеза, мутагенеза с помощью PCR и касетного мутагенеза ранее полученного являющегося вариантом или не являющегося вариантом вида антител.

Может являться желательным внесение одной или нескольких модификаций аминокислот в Fc-область полипептидов иммуноглобулинов по изобретению, таким образом получая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких положениях аминокислот, включая положения шарнирного цистеина. В соответствии с данным описанием и представлениями в данной области предполагают, что в некоторых вариантах осуществления антитела, применяемые в способах по изобретению, могут содержать одну или несколько модификаций по сравнению с аналогичными антителами дикого типа, например, в Fc-области. Эти антитела могут тем не менее сохранять по существу те же характеристики, необходимые для терапевтического применения по сравнению с их аналогом дикого типа. Например, предполагают, что в Fc-области можно осуществить определенные модификации, которые могут приводить к изменению (т.е. или улучшению, или

ухудшению) связывания с C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO 99/51642. Смотри также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов Fc-области. В WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антител с улучшенным или ухудшенным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций, в частности, приведено здесь в качестве ссылки. Смотри также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным временем полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или сниженной способностью связываться с C1q описаны в патенте США № 6194551 B1, WO 99/51642. Содержание этих патентных публикаций, в частности, приведено здесь в качестве ссылки. Смотри также Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Производные антител

Антитела по настоящему изобретению можно дополнительно модифицировать так, чтобы они содержали дополнительные небелковые группы, которые известны в данной области и легко доступны. Предпочтительно группы, подходящие для получения производных антител, представляют собой водорастворимые полимеры.

Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают без ограничения полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (или гомополимеры или статистические сополимеры) и декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси.

Полиэтиленгликольпропиональдегид может обладать преимуществами в производстве благодаря своей стабильности в воде. Полимер может обладать любой молекулярной массой и может являться разветвленным или неразветвленным.

Количество присоединенных к антителам полимеров может варьировать, и если присоединено более одного полимера, то они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. Как правило, количество и/или тип полимеров, используемых для получения производных, можно определить на основе факторов, которые включают в качестве неограничивающих примеров конкретные свойства или функции антител, которые нуждаются в улучшении, тот факт, будут ли использовать производное антител в лечении при определенных условиях, и т.п.

Скрининг на антитела с требуемыми свойствами

Антитела по настоящему изобретению можно характеризовать по их физическим/химическим свойствам и биологическим функциям с помощью различных способов анализа, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитела характеризуют по любому из одного или нескольких свойств: связывание с OX40L, снижение или блокирование активации OX40L, снижение или блокирование молекулярной передачи сигнала в направлении от OX40L, снижение или блокирование активации рецептора OX40, снижение или блокирование молекулярной

передачи сигнала в направлении от рецептора OX40, снижение или блокирование связывания OX40 с OX40L и/или мультимеризация OX40L, и/или лечение, и/или профилактика иммунного расстройства (например, астмы, аллергического ринита, атопического дерматита, рассеянного склероза, GVHF или системной красной волчанки), и/или лечение, и/или профилактика расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью OX40L (такой как усиление экспрессии и/или активности OX40L).

Очищенные антитела можно дополнительно характеризовать в ряде анализов, включающих в качестве неограничивающих примеров N-концевое секвенирование, анализ аминокислот, эксклюзионную жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC) в неденатурирующих условиях, масс-спектрометрию, ионообменную хроматографию и расщепление папаином.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела, полученные в данной работе, анализируют по их биологической активности. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению тестируют на их антигенсвязывающую активность. Способы анализа связывания антигена, которые известны в данной области и которые можно использовать в данной работе, включают в качестве неограничивающих примеров любые способы прямого или конкурентного анализа связывания с использованием способов, таких как вестерн-блоттинг, способы радиоиммунного анализа, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), способы «двухвалентного» иммуноанализа, способы анализа иммунопреципитации, способы флуоресцентного иммуноанализа и способы иммуноанализа с помощью протеина А. Наглядный анализ связывания антигена представлен ниже в разделе «Примеры».

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к моноклональным антителам к OX40L, которые конкурируют с антителами 8E12 и/или антителами 13G5 за связывание с OX40L. Такие конкурентные антитела включают антитела, которые распознают эпитоп OX40L, который совпадает с эпитопом OX40L, распознаваемым антителами 8E12 и/или 13G5, или перекрывается с ним. Такие конкурентные антитела можно получать с помощью скрининга гибридомных супернатантов с антителами к OX40L на связывание с иммобилизованным OX40L при конкуренции с мечеными антителами 8E12 и/или 13G5. Гибридомный супернатант, содержащий конкурентные антитела, снижает количество связанных меченых антител, детектируемых в рассматриваемой смеси, анализируемой на конкурентное связывание, по сравнению с количеством связанных меченых антител, детектируемых в контрольной смеси, анализируемой на связывание, содержащей посторонние антитела (или не содержащей их). Любой из описанных здесь способов конкурентного анализа связывания подходит для использования в вышеупомянутой процедуре.

Антитела к OX40L по изобретению, обладающие описанными здесь свойствами, можно получать скринингом гибридомных клонов, секретирующих антитела к OX40L, на наличие требуемых свойств любым удобным способом. Например, если требуются моноклональные антитела к OX40L, которые блокируют или не блокируют связывание рецептора OX40 с OX40L, антитела, являющиеся кандидатами, можно тестировать в конкурентном анализе связывания, таком как связывание в конкурентном ELISA, где лунки планшета покрыты OX40L, и раствор антител в избытке по отношению к рецептору OX40 наслаивают на покрытые OX40L планшеты, и связанные антитела детектируют по ферментативной реакции, например, посредством контактирования связанных антител с антителами анти-Ig, конъюгированными с HRP, или биотинилированными антителами анти-Ig, и анализа

цветной реакции, обусловленной HRP, например анализом планшетов с помощью стрептавидин-HRP и/или пероксида водорода, и детектированием цветной реакции, обусловленной HRP, спектрофотометрией при 490 нМ с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов с ELISA.

Если требуются антитела к OX40L, которые ингибируют активацию OX40L, антитела, являющиеся кандидатами, можно тестировать в анализе, с помощью которого детектируют передачу сигнала по пути, связанному с OX40L, или передачу сигнала по пути, связанному с OX40, такому как анализ передачи сигнала NFκB. Такие способы анализа известны в данной области.

Другие функциональные способы анализа для определения ингибиторной способности антител к OX40L известны в данной области, некоторые из которых приведены здесь в качестве примеров.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к измененным антителам, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают их требуемыми кандидатами для многих применений, в которых важно время полужизни антител *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции (такие как связывание комплемента и ADCC) являются необязательными или вредными. В конкретных вариантах осуществления измеряют активности Fc для продуцируемого иммуноглобулина для уверенности в том, что сохраняются только требуемые свойства. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* можно проводить для подтверждения снижения/ослабления активностей в отношении CDC и/или ADCC. Например, можно проводить анализы связывания Fc-рецептора (FcR) для уверенности в том, что у антител отсутствует связывание с FcγR (таким образом, вероятное отсутствие активности в отношении ADCC), но сохраняется способность связываться с FcRn. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на кровяных клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Пример анализа *in vitro* для оценки активности представляющей интерес молекулы в отношении ADCC описан в патенте США № 5500362 или 5821337. Пригодные для таких анализов эффекторные клетки включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или дополнительно активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Можно также осуществлять анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитела не способны связываться с C1q и, таким образом, утратили активность в отношении CDC. Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Связывание FcRn и определения клиренса/времени полужизни *in vivo* можно также осуществлять с использованием способов, известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к измененным антителам, которые обладают усиленными эффекторными функциями и/или увеличенным временем полужизни.

Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

Для рекомбинантного получения антител по изобретению кодирующую их нуклеиновую кислоту выделяют и вставляют в реплицирующийся вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК,

кодирующую антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Доступны многие векторы. Выбор вектора зависит частично от используемой клетки-хозяина. Как правило, предпочтительные клетки-хозяева обладают или прокариотическим, или эукариотическим (как правило, из млекопитающих) происхождением. Принимают во внимание, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать из любого вида человека или животных.

а. Получение антител с использованием прокариотических клеток-хозяев:

i. Конструирование векторов

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антител по изобретению, можно получать с использованием общепринятых рекомбинантных способов. Требуемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из продуцирующих антитела клеток, таких как клетки гибридом. Альтернативно полинуклеотиды можно синтезировать с использованием нуклеотидного синтезатора или способов на основе PCR. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые доступны и известны в данной области, можно использовать для цели настоящего изобретения. Отбор подходящего вектора зависит в основном от размера нуклеиновых кислот, которые вставляют в вектор, и конкретной клетки-хозяина, которую трансформируют вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от своей функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида, или и то и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора, как правило, включают в качестве неограничивающих примеров: ориджин репликации, маркерный ген для селекции, промотор, участок связывания с рибосомой (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые происходят из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используют применительно к этим хозяевам. Вектор, как правило, несет участок репликации, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечить селекцию по фенотипу трансформированных клеток. Например, *E. coli*, как правило, трансформируют с использованием рBR322, плазмиды, полученной из вида *E. coli*. рBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet) и, таким образом, дающие легкий способ выявления трансформированных клеток. рBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг могут также содержать, или их можно модифицировать так, чтобы они содержали, промоторы, которые можно использовать в микробном организме для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных рBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et al., патент США № 5648237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, можно

использовать в качестве трансформирующих векторов применительно к этим хозяевам. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, можно использовать для получения рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации чувствительных клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Экспрессирующий вектор по изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон, каждая из которых кодирует полипептидные компоненты. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию.

Прокариотические промоторы, как правило, относятся к двум классам, индуцибельным и конститутивным. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который стимулирует повышенные уровни транскрипции цистрона, находящегося под его управлением, в ответ на изменения в условиях культивирования, например присутствия или отсутствия питательного вещества, или изменение температуры.

Хорошо известно большое количество промоторов, которые распознаются множеством потенциальных клеток-хозяев. Выбранный промотор можно функционально связать с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, выделяя промотор из исходной ДНК посредством расщепления ферментами рестрикции и вставляя выделенную промоторную последовательность в вектор по изобретению. Как природную промоторную последовательность, так и множество гетерологичных промоторов можно использовать для управления амплификацией и/или экспрессией целевых генов. В некоторых вариантах осуществления используют гетерологичные промоторы, так как они, как правило, обеспечивают более высокий уровень транскрипции и более высокий выход экспрессируемого целевого гена по сравнению с природным промотором целевого полипептида.

Промоторы, подходящие для использования в прокариотических хозяевах, включают промотор *PhoA*, промоторные системы β -галактамазы и лактозы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако также пригодны другие промоторы, которые функциональны в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности опубликованы, таким образом давая возможность квалифицированному специалисту функционально лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20:269) с использованием линкеров или адаптеров для обеспечения любыми необходимыми участками рестрикции.

В одном из аспектов изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент секреторной сигнальной последовательности, который направляет перемещение экспрессируемых полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может являться компонентом вектора, или она может являться частью ДНК, кодирующей целевой полипептид, которая вставлена в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей данного изобретения, должна распознаваться клеткой-хозяином и процессироваться (т.е. расщепляться сигнальной пептидазой) в ней. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, свойственные гетерологичным полипептидам, сигнальную последовательность замещают прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или термостабильного энтеротоксина II (STII), *LamB*,

PhoE, PelB, OmpA и MBP. В одном из вариантов осуществления изобретения сигнальные последовательности, используемые для обоих цистронов экспрессионной системы, представляют собой сигнальные последовательности STП или их варианты.

В другом аспекте продукция иммуноглобулинов по изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, таким образом, не требует наличия секреторных сигнальных последовательностей в каждом цистроне. В этом случае легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов экспрессируются, сворачиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме.

Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* trxB) обеспечивают условия в цитоплазме, которые благоприятны для образования дисульфидной связи, таким образом обеспечивая правильное сворачивание и сборку экспрессируемых белковых субъединиц, Proba and Pluckthun, Gene, 159:203 (1995).

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по изобретению, включают археобактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), энтеробактерии, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonellatyphimurium*, *Serratiamarcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В одном из вариантов осуществления используют грамотрицательные клетки. В одном из вариантов осуществления используют клетки *E. coli* в качестве хозяев для конструкций по изобретению. Примеры штаммов *E. coli* включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; депонирование в ATCC № 27325) и его производные, включая штамм 33D3, обладающий генотипом W3110 Δ*h*uA (Δ*ton*A) ptr3 lac Iq lacL8 Δ*omp*TA(nmpc-fepE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Также пригодны другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, обладающих определенными генотипами, известны в данной области и описаны, например, в Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбирать соответствующие бактерии, принимая во внимание реплицируемость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно подходящим образом использовать в качестве хозяина, если для обеспечения репликации используют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и, по желанию, можно вносить дополнительные ингибиторы протеаз в культуру клеток.

ii. Продукция антител

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными экспрессирующими векторами и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина таким образом, что ДНК реплицируется или в качестве внехромосомного элемента, или в качестве хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию осуществляют с использованием общепринятых способов, пригодных для таких клеток. Обработку кальцием, используя хлорид кальция, как правило, используют для бактериальных клеток, которые обладают значительным барьером в

виде клеточной стенки. В другом способе трансформации используют полиэтиленгликоль/DMSO. Еще одним используемым способом является электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для продукции полипептидов по изобретению, выращивают в средах, известных в данной области и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают среду Лурия (LB) плюс необходимые питательные вещества. В некоторых вариантах осуществления среды также содержат вещество для осуществления отбора, выбираемое на основе конструкции экспрессирующего вектора, чтобы обеспечить избирательный рост прокариотических клеток, содержащих экспрессирующий вектор. Например, ампициллин добавляют к средам для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также можно включать в соответствующих концентрациях, вносимых по отдельности или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать одно или несколько восстанавливающих средств, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамин, тиогликолята, дитиозеритрита и дитиотрейтола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. Для выращивания *E. coli*, например, предпочтительная температура варьирует приблизительно от 20°C до приблизительно 39°C, более предпочтительно приблизительно от 25°C до приблизительно 37°C, более предпочтительно составляет приблизительно 30°C. pH среды может представлять собой любой pH, варьирующий приблизительно от 5 до приблизительно 9, в основном в зависимости от организма-хозяина. Для *E. coli* pH составляет предпочтительно приблизительно от 6,8 до приблизительно 7,4 и более предпочтительно приблизительно 7,0.

Если в экспрессирующем векторе по изобретению используют индуцируемый промотор, то экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном из аспектов изобретения используют промоторы PhoA для регуляции транскрипции полипептидов. Таким образом, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде для индукции, содержащей ограниченное количество фосфата. Предпочтительно среда, содержащая ограниченное количество фосфата, представляет собой среду C.R.A.P (смотри, например, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Можно использовать множество других индукторов в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно в данной области.

В одном из вариантов осуществления экспрессируемые полипептиды по настоящему изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев, и их выделяют из нее. Выделение белка, как правило, включает разрушение микроорганизма, как правило, такими способами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток остатки клеток или целые клетки можно удалить центрифугированием или фильтрацией. Белки можно дополнительно очищать, например, хроматографией на аффинной смоле. Альтернативно белки можно переносить в культуральные среды и выделять из них. Клетки можно удалять из культуры, и культуральный супернатант фильтровать и концентрировать для дальнейшей очистки продуцированных белков. Экспрессируемые полипептиды можно далее выделять и идентифицировать с использованием общепринятых способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и анализ с помощью вестерн-блоттинга.

В одном из аспектов изобретения продукцию антител осуществляют в больших количествах при помощи процесса ферментации. Различные крупномасштабные процедуры ферментации при культивировании с подпиткой доступны для продукции рекомбинантных белков. Крупномасштабные способы ферментации предусматривают, по меньшей мере, емкость в 1000 литров, предпочтительно емкость приблизительно от 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используют лопастные перемешиватели для распределения кислорода и питательных веществ, в особенности глюкозы (предпочтительный источник углерода/энергии). Мелкомасштабная ферментация означает, как правило, ферментацию в ферментере, объемная емкость которого не превышает приблизительно 100 литров и может варьировать приблизительно от 1 литра до приблизительно 100 литров.

В процессе ферментации индукцию экспрессии белка, как правило, начинают после того, как клетки вырастают при подходящих условиях до требуемой плотности, например OD₅₅₀ приблизительно 180-220, на этой стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. Можно использовать множество индукторов в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно в данной области и описано выше. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов перед индукцией. Клетки, как правило, индуцируют приблизительно 12-50 часов, хотя можно использовать более длительное или более короткое время индукции.

Для улучшения выхода продукции и качества полипептидов по изобретению можно изменять различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и сворачивания секретируемых полипептидов антител можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил-цис, транс-изомераза с шаперонной активностью) при совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Показано, что белки-шапероны способствуют правильному сворачиванию и растворимости гетерологичных белков, продуцируемых бактериальными клетками-хозяевами, Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Для снижения до минимума протеолиза экспрессируемых гетерологичных белков (в особенности белков, которые чувствительны к протеолизу) можно использовать для настоящего изобретения определенные штаммы-хозяева с нарушенными протеолитическими ферментами. Например, штаммы клеток-хозяев можно модифицировать для получения генетической(их) мутации(ий) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их сочетания. Некоторые штаммы *E. coli* с нарушенными протеазами доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент США № 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В одном из вариантов осуществления штаммы *E. coli* с нарушенными протеолитическими ферментами и трансформированными плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков-шаперонов, используют в качестве клеток-хозяев в экспрессионной системе по изобретению.

iii. Очистка антител

Можно использовать общепринятые способы очистки белка, известные в данной области. Следующие способы приведены в качестве примера из подходящих способов

очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на кремнеземе или катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с использованием, например, сефадекса G-75.

В одном из аспектов протеин А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки полноразмерных продуктов антител по изобретению. Протеин А представляет собой белок клеточной стенки массой 41 кДа из

Staphylococcus aureus, который связывается с высокой аффинностью с Fc-областью антител, Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован протеин А, представляет собой предпочтительно колонку, содержащую стеклянную или кремнеземную поверхность, более предпочтительно стеклянную колонку с контролируемым размером пор или колонку на основе кремниевой кислоты. В некоторых вариантах осуществления колонку покрывают реагентом, таким как глицерин, с целью предотвращения неспецифической сорбции примесей.

В качестве первой стадии очистки препарат, полученный из культуры клеток, как описано выше, помещают на твердую фазу с иммобилизованным протеином А для обеспечения специфического связывания представляющих интерес антител с протеином А. Твердую фазу затем промывают для удаления примесей, неспецифически связавшихся с твердой фазой. В заключение представляющие интерес антитела удаляют с твердой фазы элюцией.

б. Получение антител с использованием эукариотических клеток-хозяев:

Компоненты векторов, как правило, включают в качестве неограничивающих примеров одно или несколько из следующего: сигнальная последовательность, ориджин репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

(i) Компонент сигнальной последовательности

Вектор для использования в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, обладающий специфическим участком расщепления на N-конце представляющего интерес зрелого белка или полипептида. Гетерологичную сигнальную последовательность выбирают предпочтительно таким образом, чтобы она распознавалась клеткой-хозяином и процессировалась (т.е. отщеплялась сигнальной пептидазой) в ней. Для экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например gD-сигнал вируса простого герпеса.

ДНК, кодирующую такую лидерную область, лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитела.

(ii) Ориджин репликации

Как правило, компонент ориджина репликации не является необходимым для экспрессирующих векторов млекопитающих. Например, ориджин SV40 можно, как правило, использовать только потому, что он содержит ранний промотор.

(iii) Компонент гена, обеспечивающего селекцию

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген, обеспечивающий селекцию, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены, обеспечивающие селекцию, кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину,

метотрексату или тетрациклину, (b) комплементируют ауксотрофную недостаточность в соответствующих условиях, или (c) обеспечивают жизненно важными питательными веществами, которые не доступны в комплексных средах.

В одном из примеров процедуры селекции используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в условиях селекции. Примеры такой доминантной селекции включают лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

Другим примером подходящих селектируемых маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина приматов, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п., которые позволяют идентифицировать клетки, компетентные в отношении поглощения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитела.

Например, клетки, трансформированные обеспечивающим селекцию геном DHFR, сначала выявляют при культивировании всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. При использовании DHFR дикого типа соответствующей клеткой-хозяином является линия клеток яичника китайского хомяка (CHO) с нарушенной активностью DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитела, белок DHFR дикого типа и другой селектируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать по росту клеток в среде, содержащей обеспечивающее селекцию вещество для селектируемого маркера, такое как аминокликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199.

(iv) Компонент промотора

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и который функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид антител. Промоторные последовательности известны для эукариот. Практически все эукариотические гены обладают АТ-богатой областью, расположенной приблизительно на 25-30 оснований выше участка инициации транскрипции. Другая последовательность, расположенная на 70-80 оснований выше от начала транскрипции во многих генах, представляет собой область CNCAAT, где N может являться любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А-хвоста на 3'-конец кодирующей последовательности. Все эти последовательности надлежащим образом вставляют в эукариотические экспрессирующие векторы.

Транскрипцией полипептидов антител на векторах в клетках-хозяевах млекопитающих управляют, например, промоторы, получаемые из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус чумы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотора актина или промотора иммуноглобулина, из

промоторов теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусный ориджин репликации SV40. Предранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в млекопитающих-хозяевах с использованием вируса бычьей папилломы в качестве вектора описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. Альтернативно длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса можно использовать в качестве промотора.

(v) Компонент энхансерного элемента

Транскрипция ДНК, кодирующей полипептид антител по данному изобретению, у высших эукариот часто повышается посредством вставки энхансерной последовательности в вектор. Многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина) известны в настоящее время. Как правило, однако используют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне от ориджина репликации (100-270 т.п.о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы на поздней стороне от ориджина репликации и энхансеры аденовируса. Смотри также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) относительно энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер можно встроить в вектор в 5'- или 3'-положении по отношению к последовательности, кодирующей полипептид антител, но предпочтительно размещать на 5'-участке от промотора.

(vi) Компонент терминации транскрипции

Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, как правило, также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно расположены в 5'- и иногда в 3'-нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитела. Один из пригодных компонентов терминации транскрипции представляет собой область полиаденилирования гормона роста быка. Смотри WO94/11026 и описанный в этой работе экспрессирующий вектор.

(vii) Селекция и трансформация клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в настоящей работе включают клетки высших эукариот, описанные в настоящей работе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. Примеры пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию почки мартышки CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию эмбриональной почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки мартышки (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого

человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными экспрессирующими или клонирующими векторами для продукции антител и культивируют в общепринятых питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

(viii) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для получения антител по данному изобретению, можно культивировать во множестве сред. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, в качестве культуральных сред для клеток-хозяев можно использовать любую из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469, WO 90/03430, WO 87/00195 или патенте США № Re. 30985. В любую из этих сред можно добавить в случае необходимости гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или фактор роста эпидермиса), соли (такие как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство гентамицин™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях порядка микромолей) и глюкозу или эквивалентный источник энергии. Любые другие необходимые добавки можно также вносить в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, использованные ранее для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и очевидны для обычного специалиста.

(ix) Очистка антител

С использованием рекомбинантных способов антитела можно продуцировать внутриклеточно или непосредственно секретировать в среду. Если антитела продуцируют внутриклеточно, то в качестве первой стадии дебрис в виде частиц или клетки-хозяева, или лизированные фрагменты удаляют, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Если антитела секретируются в среду, то супернатанты из таких экспрессионных систем, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например комплекта для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Можно вносить ингибитор протеаз, такой как PMSF, на любой из вышеописанных стадий для ингибирования протеолиза и можно вносить антибиотики для предотвращения роста случайных контаминантов.

Композицию антител, полученную из клеток, можно очищать с использованием, например, хроматографии с гидроксилapatитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, где аффинная хроматография является предпочтительным способом очистки. Пригодность протеина А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, который находится в антителе. Протеин А можно использовать для очистки антител, в основе которых лежат тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)).

Протеин G рекомендован для всех изотипов мыши и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, однако доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем те, которые можно достичь с помощью агарозы. В случае, когда антитело содержит домен СНЗ, для очистки пригодна смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Также в зависимости от антитела, подлежащего выделению, доступны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, HPLC с обращенной фазой, хроматография на кремнеземе, хроматография на сефарозе™ с гепарином, хроматография на анионной или катионной обменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение с сульфатом аммония.

После любой(ых) предварительной(ых) стадии(ий) очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергать хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким значением pH с использованием буфера для элюции со значением pH приблизительно между 2,5-4,5, которую предпочтительно проводят при низких концентрациях соли (например, приблизительно 0-0,25 М соль).

Иммуноконъюгаты

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам (взаимозаменяемо обозначаемым как «конъюгаты антитело-лекарственное средство» или «ADC»), содержащим любые описанные в данной работе антитела к OX40L, конъюгированные с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, средство ингибирования роста, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Использование конъюгатов антитело-лекарственное средство для местной доставки цитотоксических или цитостатических средств, т.е. лекарственных средств, для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток при лечении рака (Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; патент США № 4975278) обеспечивает целенаправленную доставку компонента лекарственного средства к опухолям и его внутриклеточное накопление в них, если системное введение этих неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток, а также когда стремятся элиминировать опухолевые клетки (Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review» в Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Таким образом, стремятся достичь максимальной эффективности при минимальной токсичности. Сообщалось, что как поликлональные антитела, так и моноклональные антитела пригодны для этих способов (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Лекарственные средства, используемые в этих способах, включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндезин (Rowland et al., (1986), выше). Токсины, используемые в конъюгатах антитело-токсин, включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al. (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst.

92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) и калихеамицин (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Токсины могут
 5 вызывать цитотоксические и цитостатические эффекты посредством механизмов, включая связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства обладают тенденцией инактивироваться или становиться менее активными при конъюгировании с
 10 крупными антителами или белковыми лигандами рецепторов.

ЗЕВАЛИН® (ибритумомаб тиуксетан, Biogen/Idec) представляет собой конъюгат антитело-радиоизотоп, состоящий из мышиных моноклональных антител IgG1 kappa, направленных против антигена CD20, представленного на поверхности нормальных и
 15 малигнизированных В-лимфоцитов, и радиоизотопа ^{111}In или ^{90}Y , связанного тиомочевинным хелатным линкером (Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77; Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63; Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Хотя ЗЕВАЛИН обладает активностью против В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), его введение
 20 вызывает тяжелые и длительные цитопении у большинства пациентов.

МИЛОТАРГ™ (гемтузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceuticals), конъюгат антител с лекарственным средством, состоящий из антител к CD33 человека, связанных с калихеамицином, получил одобрение в 2000 для лечения острого миелоидного лейкоза при помощи инъекции (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенты США №№ 4970198; 25 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), конъюгат антител с лекарственным средством, состоящий из антител huC242, связанных посредством дисульфидного линкера SPP с компонентом лекарственного средства на основе майтанзиноидов, DM1, проходит
 30 фазу II исследований для лечения видов рака, при которых экспрессируется CanAg, таких как рак толстой кишки, поджелудочной железы, желудка и др. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen, Inc.), конъюгат антител с лекарственным средством, состоящий из моноклональных антител против специфичного для
 35 поджелудочной железы мембранного антигена (PSMA), связанных с компонентом лекарственного средства на основе майтанзиноидов, DM1, находится в состоянии разработки для возможного лечения опухолей поджелудочной железы.

Ауристатиновые пептиды, ауристатин E (AE) и монометилауристатин (ММАЕ), синтетические аналоги доластатина, конъюгировали с химерными моноклональными
 40 антителами cBR96 (специфичными к Lewis Y на карциномах) и cAC10 (специфичными к CD30 на гематологических опухолях) (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784), и они находятся в состоянии терапевтической разработки.

Химиотерапевтические средства, пригодные для получения иммуноконъюгатов, описаны в данной работе (например, выше). Ферментативно активные токсины и их
 45 фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonasaeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleuritesfordii*, белки диантина, белки *Phytolacaamericana* (PAPI, PAPII и PAP-S),
 50 ингибитор *Momordicacharantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonariaofficinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См. например, WO 93/21232, опубликованный 28 октября, 1993. Множество радионуклидов доступно для получения радиоконъюгатов антител. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и

¹⁸⁶Re. Конъюгаты антител и цитотоксического средства получают с использованием множества бифункциональных веществ, присоединяющих белок, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин можно получить, как описано в Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичное хелатирующее средство для конъюгации радионуклеотида с антителом. Смотри WO94/11026.

Также предусмотрены в данной работе конъюгаты антител и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтанзиноиды, доластатины, ауростатины, трихотецен и CC1065, и производные этих токсинов, которые обладают активностью токсина.

i. Майтанзин и майтанзиноиды

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитела (полноразмерные или фрагменты) по изобретению, конъюгированные с одной или несколькими молекулами майтанзиноидов.

Майтанзиноиды представляют собой ингибиторы митоза, которые действуют посредством ингибирования полимеризации тубулина. Впервые майтанзин был выделен из восточно-африканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Затем было обнаружено, что определенные микробы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры майтанзинола C-3 (патенты США №№ 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги описаны, например, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533.

Компоненты лекарственного средства на основе майтанзиноидов являются привлекательными компонентами лекарственных средств в конъюгатах антител с лекарственным средством вследствие того, что они: (i) относительно доступны для получения ферментацией или химической модификацией, получением производных продуктов ферментации, (ii) пригодны для получения производных с помощью функциональных групп, подходящих для конъюгации посредством недисульфидных линкеров с антителами, (iii) стабильны в плазме, и (iv) эффективны против множества линий опухолевых клеток.

Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение описаны, например, в патентах США № 5208020, 5416064 и в европейском патенте EP 0425235 B1, описание которых приведено здесь явно в качестве ссылки. В Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) описаны иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначаемый как DM1, связанный с моноклональными антителами C242, направленными против колоректального рака человека. Обнаружено, что конъюгат является высокоцитотоксичным в отношении культивируемых клеток рака толстого кишечника, и он проявлял противоопухолевую активность в анализе роста опухоли *in vivo*. В Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992) описаны иммуноконъюгаты, в которых майтанзиноид конъюгировали

посредством дисульфидного линкера с антителами мыши А7, связывающимися с антигеном на линиях клеток рака толстого кишечника человека или с другими моноклональными антителами мыши ТА.1, которые связываются с онкогеном HER-2/*neu*. Цитотоксичность конъюгата ТА.1-майтаниноид тестировали *in vitro* на линии 5 клеток рака молочной железы человека SK-BR-3, которая экспрессирует 3×10^5 поверхностных антигенов HER-2 на клетку. Конъюгат с лекарственным средством достигал степени цитотоксичности, сходной со свободным лекарственным средством на основе мaitаниноидов, которую можно повышать путем увеличения количества 10 молекул мaitаниноида на молекулу антител. Для конъюгата А7-майтаниноид на мышцах показана низкая системная цитотоксичность.

Конъюгаты антитело-майтаниноид получают, химически связывая антитела с молекулой мaitаниноида без значительного снижения биологической активности или антител, или молекулы мaitаниноида. Смотри, например, патент США № 5208020 15 (описание которого приведено здесь явно в качестве ссылки). В среднем 3-4 молекулы мaitаниноида, конъюгированные с молекулой антитела, обладают эффективностью в усилении цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням без отрицательного воздействия на функцию или растворимость антител, хотя даже одна молекула 20 токсина на антитело, как можно ожидать, усиливает цитотоксичность по сравнению с использованием неконъюгированных антител. Мaitаниноиды хорошо известны в данной области, и их можно синтезировать известными способами или выделять из природных источников. Подходящие мaitаниноиды описаны, например, в патенте США № 5208020 и в других патентах и не являющихся патентами публикациях, ссылки 25 на которые приведены выше в данном описании. Предпочтительные мaitаниноиды представляют собой мaitанинол и аналоги мaitанинола, модифицированные по ароматическому кольцу или по другим положениям молекулы мaitанинола, такие как различные сложные эфиры мaitанинола.

В данной области известно множество связующих групп для получения конъюгатов антитело-майтаниноид, включая, например, группы, описанные в патенте США № 5208020 или в европейском патенте 0425235 В1, Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992), и патентной заявке США № 10/960602, зарегистрированной 8 октября 2004, 30 описания которых приведены здесь явно в качестве ссылки. Конъюгаты антитело-майтаниноид, содержащие линкерный компонент SMCC, можно получать, как описано в патентной заявке США № 10/960602, зарегистрированной 8 октября 2004. Связующие группы включают дисульфидные группы, тиоэфирные группы, неустойчивые к кислотам группы, фотолabile группы, неустойчивые к действию 40 пептидаз группы или неустойчивые к действию эстераз группы, как описано в указанных выше патентах, где дисульфидные и тиоэфирные группы являются предпочтительными. Дополнительные связующие группы описаны и приведены в качестве примеров в настоящем описании.

Конъюгаты антитела и мaitаниноида можно получать с использованием 45 множества бифункциональных веществ для присоединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), 50 активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-diazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора

(такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Особенно предпочтительные вещества для присоединения включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP) для обеспечения образования дисульфидной связи.

Линкер можно присоединять к молекуле майтанзиноида в различных положениях в зависимости от типа связи. Например, сложноэфирная связь может образоваться посредством реакции с гидроксильной группой с использованием общепринятых способов присоединения. Реакция может протекать в положении C-3 с гидроксильной группой, в положении C-14, модифицированном гидроксиметилом, в положении C-15, модифицированном гидроксильной группой, и в положении C-20 с гидроксильной группой. В предпочтительном варианте осуществления связь образуется в положении C-3 майтанзинола или аналога майтанзинола.

ii. Ауристатины и доластатины

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитела по изобретению, конъюгированные с доластатинами или пептидными аналогами и производными доластатина, ауристатинами (патенты США № 5635483; 5780588). Показано, что доластатины и ауристатины нарушают динамику микротрубочек, гидролиз GTP и ядерное и клеточное деление (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой (US 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Компонент лекарственного средства на основе доластатина или ауристатина можно присоединять к антителам посредством N-конца (амино) или C-конца (карбоксил) компонента пептидного лекарственного средства (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления с применением ауристатина включают компоненты лекарственного средства на основе связанного с N-концом монометилауристатина DE и DF, описанные в «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands», US Ser. № 10/983340, зарегистрированном 5 ноября 2004, описание которого явно приведено в качестве ссылки в полном объеме.

Как правило, компоненты лекарственного средства на основе пептидов можно получать путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получать, например, согласно способу жидкофазного синтеза (смотри E. Schröder and K. Lübke, «The Peptides», volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Компоненты лекарственного средства на основе ауристатина/доластатина можно получать согласно способам: US 5635483; US 5780588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; и Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Смотри также Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands», US Ser. № 10/983340, зарегистрированный 5 ноября 2004, приведенный здесь в качестве ссылки в полном объеме (описание, например, линкеров и способов получения монометилвалиновых соединений, таких как MMAE и MMAF, конъюгированных с линкерами).

iii. Калихеамицин

В других вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитела по изобретению, конъюгированные с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Антибиотики семейства калихеамицина способны создавать двухцепочечные разрывы ДНК в субпикомолярных концентрациях. Для получения

конъюгатов семейства калихеамицина смотри патенты США 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все выданы American Cyanamid Company). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают в качестве неограничивающих примеров γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ_1^I (Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США, выданные American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым можно конъюгировать антитело, является QFA, который представляет собой антифолат. Как калихеамицин, так и QFA обладают внутриклеточным действием, и они нелегко проходят через плазматическую мембрану. Таким образом, клеточный захват этих веществ посредством опосредуемой антителами интернализации значительно повышает их цитотоксические эффекты.

iv. Другие цитотоксические средства

Другие противоопухолевые средства, которые можно конъюгировать с антителами по изобретению, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил, семейство средств, известное под собирательным названием комплекс LL-E33288, описанный в патентах США №№ 5053394, 5770710, а также эсперамицины (патент США № 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonasaeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleuritesfordii*, белки диантина, белки *Phytolacaamericana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор *Momordicacharantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonariaofficinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Смотри, например, WO 93/21232, опубликованный 28 октября, 1993.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к иммуноконъюгату, образованному антителами и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазе или ДНК-эндонуклеазе, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для селективного разрушения опухоли антитела могут содержать высокорadioактивный атом. Для получения радиоактивных конъюгированных антител доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. В случае применения конъюгата для детекции он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например tc^{99m} или I^{123} , или спиновую метку для получения изображения ядерного магнитного резонанса (NMR) (также известного как магнитно-резонансная томография, MRI), такую как йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Радиоактивные или другие метки можно встраивать в конъюгат известными способами. Например, пептид можно биологически синтезировать или можно синтезировать посредством химического синтеза аминокислот с использованием пригодных предшественников аминокислот, содержащих, например, фтор-19 вместо водорода. Метки, такие как tc^{99m} или I^{123} , Re^{186} , Re^{188} и In^{111} , можно присоединять через остаток цистеина в пептиде. Иттрий-90 можно присоединять через остаток лизина. Способ с ИОДОГЕНОМ (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) можно использовать для встраивания йода-123. В «Monoclonal Antibodies in

Immunoscintigraphy» (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства можно получать с использованием множества бифункциональных веществ для присоединения белка, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипамидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ригин можно получать, как описано в Vitetta et al. Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративный хелатирующий агент для конъюгации радионуклида с антителом. Смотри WO94/11026. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать неустойчивый к кислотам линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992); патент США № 5208020).

Соединения по изобретению явным образом включают в качестве неограничивающих примеров ADC, полученные с помощью перекрестносшивающих реагентов: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS, сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB, сульфид-SMCC и сульфид-SMPB, и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые коммерчески доступны (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Смотри страницы 467-498, 2003-2004 в Applications Handbook and Catalog.

v. Получение конъюгатов антител с лекарственным средством

В конъюгатах антител с лекарственными средствами (ADC) по изобретению антитела (Ab) конъюгированы с одним или несколькими компонентами лекарственного средства (D), например приблизительно от 1 до приблизительно 20 компонентов лекарственного средства на антитело, посредством линкера (L). ADC формулы I можно получать несколькими способами, включая реакции органической химии, условия и реагенты, известные специалистам в данной области, включая: (1) взаимодействие нуклеофильной группы антитела с бивалентным линкерным реагентом с образованием Ab-L посредством ковалентной связи с последующим взаимодействием с компонентом лекарственного средства D; и (2) взаимодействие нуклеофильной группы компонента лекарственного средства с бивалентным линкерным реагентом с образованием D-L посредством ковалентной связи с последующим взаимодействием с нуклеофильной группой антитела. Дополнительные способы получения ADC описаны в настоящей работе.

Ab-(L-D)_p

I

Линкер может состоять из одного или нескольких компонентов линкера. Типичные компоненты линкеров включают 6-малеимидокапроил («MC»), малеимидопропаноил («MP»), валин-цитруллин («val-cit»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), п-аминобензилоксикарбонил («PAB»), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат

(«SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC») и N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат («SIAB»). Дополнительные компоненты линкеров известны в данной области и некоторые описаны в данной работе. Смотри также «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands»,
 5 US Ser. № 10/983340, зарегистрированный 5 ноября 2004, содержание которого приведено здесь в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать аминокислотные остатки. Типичные аминокислотные компоненты линкера включают дипептид,
 10 трипептид, тетрапептид или пентапептид. Типичные дипептиды включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Типичные трипептиды включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотные остатки, которые входят в состав аминокислотного компонента линкера, включают остатки, существующие в природе, а также минорные
 15 аминокислоты и не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные компоненты линкера можно конструировать и оптимизировать по их избирательности в отношении к ферментативному расщеплению конкретными ферментами, например ассоциированной с опухолями протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмином.

Нуклеофильные группы на антителах включают в качестве неограничивающих примеров: (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковой цепи, например лизин, (iii) тиоловые группы боковой цепи, например цистеин, и (iv) гидроксильные
 25 группы или аминогруппы сахаров, если антитела гликозилированы. Аминогруппы, тиоловые и гидроксильные группы являются нуклеофилами и способны взаимодействовать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на компонентах линкера, где линкерные реагенты включают: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, трехгалоидные
 30 производные и галогениды кислот; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галоацетамида; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеимидные группы. Некоторые антитела обладают восстанавливаемыми межцепочечными дисульфидами, т.е. цистеиновыми мостиками. Антитела можно получать в активной форме для конъюгации с линкерными реагентами обработкой восстанавливающим реагентом,
 35 таким как DTT (дитиотрейтол). Каждый цистеиновый мостик, таким образом, образуется, теоретически, из двух активных тиоловых нуклеофилов. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитела с помощью взаимодействия лизинов с 2-иминотиолоном (реагент Траута), что приводит к превращению амина в
 40 тиол. Активные тиоловые группы можно вводить в антитела (или их фрагменты) введением одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например, получая мутантные антитела, содержащие один или несколько не природных аминокислотных остатков цистеина).

Конъюгаты антител с лекарственными средствами по изобретению можно также
 45 получать модификацией антител путем введения электрофильных групп, которые могут реагировать с нуклеофильными заместителями на линкерном реагенте или лекарственном средстве. Сахара гликозилированных антител можно окислять, например, окисляющими реагентами на основе периодата с образованием
 50 альдегидных или кетоновых групп, которые могут реагировать с аминогруппой линкерных реагентов или компонентов лекарственного средства. Получаемые группы иминового основания Шиффа могут образовывать стабильную связь, или их можно восстанавливать, например, с помощью борогидридных реагентов с образованием

стабильных аминных связей. В одном из вариантов осуществления взаимодействие углеводной части гликозилированных антител с либо галактозооксидазой, либо метaperиодатом натрия может приводить к образованию карбонильных (альдегидных и кетоновых) групп в белке, которые могут реагировать с соответствующими группами на лекарственном средстве (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В другом варианте осуществления белки, содержащие N-концевые остатки серина или треонина, могут взаимодействовать с метaperиодатом натрия, приводя к образованию альдегида на месте первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Такой альдегид может реагировать с компонентом лекарственного средства или нуклеофилом линкера.

Аналогичным образом, нуклеофильные группы на компоненте лекарственного средства включают в качестве неограничивающих примеров: аминогруппы, тиоловые, гидроксильные, гидразидные, оксимные, гидразиновые, тиосемикарбазоновые, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на компонентах линкера, где линкерные реагенты включают: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBT, трехгалоидные производные и галогениды кислот; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галоацетамиды; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеинимидные группы.

Альтернативно слитый белок, содержащий антитела и цитотоксическое средство, можно получать, например, рекомбинантными способами или пептидным синтезом. ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, или примыкающие друг к другу, или разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не нарушает требуемые свойства конъюгата.

В другом варианте осуществления антитела можно конъюгировать с «рецептором» (таким как стрептавидин) для использования в предварительном «превращении опухоли в мишень», где конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту, с последующим удалением несвязавшегося конъюгата из кровотока с использованием средства, обеспечивающего клиренс, и затем введением «лиганда» (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим средством (например, радиоактивно меченным нуклеотидом).

Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции, содержащие антитела по изобретению, получают в целях хранения посредством смешивания антител, обладающих требуемой степенью чистоты, необязательно с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), в форме водных растворов, лиофилизированных или обезвоженных композиций. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и они включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный, гистидиновый и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензэтония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (приблизительно менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин,

гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или
 5 неионные поверхностно-активные вещества, такие как ТВИН™, ПЛЮРОНИК™ или полиэтиленгликоль (PEG).

В данной работе композиция также может содержать более одного активного соединения, если это необходимо при конкретном показании для лечения,
 10 предпочтительно активные соединения с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного действия друг на друга. Такие молекулы соответствующим образом присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для намеченной цели.

Активные ингредиенты также можно включать в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или посредством межфазной полимеризации, например, микрокапсулы на основе гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы на основе полиметилметакрилата, соответственно, в коллоидных системах для доставки лекарственного средства (например, липосомах, альбуминовых
 15 микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие способы описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000).

Составы, предназначенные для применения с введением *in vivo*, должны быть стерильными. Этого легко достигают посредством фильтрации через стерильные
 25 фильтрационные мембраны.

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Примеры пригодных препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих иммуноглобулин по изобретению, где
 30 матрицы находятся в форме обладающих определенной формой частиц, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли-2-гидроксиэтилметакрилат или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата леупролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры,
 40 такие как на основе этиленвинилацетата и молочной кислоты-гликолевой кислоты, способны высвобождать молекулы в течение 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Если инкапсулированные иммуноглобулины остаются в организме в течение длительного времени, то они могут денатурировать или агрегировать под действием влажности при 37°C, что приводит к утрате биологической активности и возможным изменениям
 45 иммуногенности. Можно разработать рациональные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации состоит в образовании межмолекулярных S-S связей посредством превращения тиола в дисульфид, то стабилизации можно достичь модификацией сульфгидрильных остатков, лиофилизацией из кислотных растворов, контролированием содержания воды с использованием подходящих добавок и разрабатывая специфические композиции на основе полимерных матриц.

Применения

Антитела по настоящему изобретению можно применять, например, в терапевтических способах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

В одном из аспектов изобретение относится к способам лечения или профилактики иммунного расстройства, где способы включают введение эффективного количества антител к OX40L субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой иммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, GVHD и/или системную красную волчанку. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой заболевание, связанное с вирусом, бактериями или другим инфекционным агентом. Смотри US 2005/0069548 A1.

Более того, по меньшей мере, некоторые антитела по изобретению могут связываться с антигеном из других видов. Таким образом, антитела по изобретению можно применять для связывания со специфической антигенной активностью, например, в культуре клеток, содержащей антиген, в организме человека или в организме других млекопитающих, содержащих антиген, с которым антитела по изобретению перекрестно реагируют (например, шимпанзе, бабуин, игрунка, *Сynomolgus* и макак-резус, свинья или мышь). В одном из вариантов осуществления антитела по изобретению можно применять для ингибирования активностей антигена контактированием антител с антигеном таким образом, что происходит ингибирование активности антигена. Предпочтительно антиген представляет собой белковую молекулу человека.

В одном из вариантов осуществления антитела по изобретению можно применять в способе связывания антигена у субъекта, страдающего расстройством, связанным с повышенной экспрессией и/или активностью антигена, где способ включает введение субъекту антител по изобретению таким образом, что происходит связывание антигена у субъекта. Предпочтительно антиген представляет собой белковую молекулу человека, и субъект является человеком. Альтернативно субъект может являться млекопитающим, экспрессирующим антиген, с которым связываются антитела по изобретению. Кроме того, субъект может являться млекопитающим, которому ввели антиген (например, введением антигена или экспрессией трансгенного антигена). Антитела по изобретению можно вводить человеку с терапевтическими целями. Более того, антитела по изобретению можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему, экспрессирующему антиген, с которым перекрестно реагирует иммуноглобулин (например, примату, свинье или мыши) с ветеринарными целями, или используя его в качестве модельного животного для заболевания человека. Относительно вышесказанного, такие модельные животные могут являться пригодными для оценки терапевтической эффективности антител по изобретению (например, тестирования дозировок и продолжительности курсов введения).

Антитела по изобретению можно применять для лечения, ингибирования, приостановки прогрессирования, предотвращения/приостановки возникновения рецидива, облегчения течения или предотвращения заболеваний, расстройств или состояний, связанных с экспрессией и/или активностью одной или нескольких молекул антигена.

В конкретных вариантах осуществления иммуноконъюгат, содержащий антитела,

конъюгированные с одним или несколькими цитотоксическим(ими) средством(ами), вводят пациенту. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат и/или антиген, с которым он связывается, интернализуется(ются) клеткой, что приводит к повышению терапевтической эффективности иммуноконъюгата в уничтожении

5 клетки-мишени, с которой он связывается. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое средство нацелено на нуклеиновую кислоту клетки-мишени или препятствует ее функционированию. В одном из вариантов осуществления цитотоксическое средство нацелено на полимеризацию микротрубочек или

10 препятствует ей. Примеры таких цитотоксических средств включают любые химиотерапевтические средства, упомянутые в настоящем описании (такие как майтанзиноид, ауристатин, доластатин или калихеамицин), радиоактивный изотоп, или рибонуклеазу, или ДНК-эндонуклеазу.

Антитела по изобретению можно применять для лечения или в виде монотерапии

15 или в сочетании с другими композициями. Например, антитела по изобретению можно совместно вводить с другими антителами, стероидами (такими как стероиды для ингаляционного, системного или кожного введения), химиотерапевтическим(ми) средством(ами) (включая коктейли химиотерапевтических средств), другим(ми) цитотоксическим(ми) средством(ми), антиангиогенным(ми) средством(ми),

20 цитокинами и/или средством(ми) ингибирования роста. Такие упомянутые выше сочетанные схемы лечения включают совместное введение (при котором два или более средств входят в состав одной и той же или разных композиций) и отдельное введение, при котором введение антител по изобретению можно осуществлять перед

25 проведением вспомогательной терапии или нескольких видов терапии и/или после него. Эффективные количества терапевтических средств, вводимых в сочетании с антителами анти-EphB4, находятся на усмотрении врача или ветеринара. Введение доз и их корректировку осуществляют с целью достижения наилучшей тактики при

30 подлежащих лечению состояниях. Кроме того, дозировка зависит от таких факторов, как тип используемого терапевтического средства и конкретный подлежащий лечению пациент. В конкретных вариантах осуществления сочетание ингибиторов потенцирует эффективность одиночного ингибитора. Термин «потенцирование» относится к улучшению эффективности терапевтического средства в его общепринятой или

35 одобренной дозировке.

Антитело по изобретению (и вспомогательное терапевтическое средство) вводят любыми подходящими способами, включая парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное и, если требуется для местного

40 лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитела соответствующим образом вводят пульсовой инфузией, в частности, со снижением доз антител. Введение доз можно осуществлять любым подходящим способом, например инъекциями, такими как

45 внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или хроническим.

Композицию антитела по изобретению составляют, дозируют и вводят в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы для рассмотрения в

50 данном контексте включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное вскармливающее, подлежащее лечению, клиническое состояние конкретного пациента, причину расстройства, участок доставки средства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

Антитела необязательно составляют в композицию с одним или несколькими средствами, в настоящее время используемыми для профилактики или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других средств зависит от количества антител по изобретению, присутствующих в композиции, типа

5 расстройства или лечения и других факторов, рассмотренных выше. Их, как правило, используют в тех же дозах и способах введения, какие применяют выше в данном описании, или приблизительно от 1 до 99% от ранее используемых дозировок.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка антител

10 по изобретению (при использовании в виде монотерапии или в сочетании с другими средствами) зависит от типа подлежащего лечению заболевания, типа антител, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитела с профилактическими или терапевтическими целями, предыдущего лечения, истории болезни пациента и ответа на антитела, и усмотрения лечащего врача. Антитела подходящим образом вводят

15 пациенту за один раз или в ходе курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, приблизительно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1 мг/кг-10 мг/кг) антител составляет начальную возможную дозировку для введения пациенту или, например, в виде одного или нескольких отдельных введений, или в виде непрерывной

20 инфузии. Одна типичная суточная дозировка может варьировать приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от вышеупомянутых факторов. При повторных введениях в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не наступит требуемое ослабление симптомов заболевания. Одна из примерных дозировок антител находится в

25 диапазоне приблизительно от 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Таким образом, пациенту можно вводить одну или несколько доз из расчета приблизительно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 10 мг/кг (или любые их сочетания). Такие дозы можно вводить периодически, например каждую неделю или каждые три недели (например,

30 таким образом, что пациент получает приблизительно от двух до приблизительно двадцати, например, приблизительно шесть доз антител). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, с последующими одной или несколькими более низкими дозами. Примерный режим дозирования включает введение начальной ударной дозы из расчета приблизительно 4 мг/кг с последующей поддерживающей дозой в течение

35 недели на уровне приблизительно 2 мг/кг антител. Однако можно использовать другие режимы дозирования. Ход такого лечения легко отслеживать посредством общепринятых способов и анализов.

Антитела к OX40L по изобретению пригодны для анализов, в которых детектируют экспрессию OX40L (таких как диагностические или прогностические анализы) в

40 конкретных клетках или тканях, где антитела подвергают мечению, как описано ниже, и/или иммобилизуют на нерастворимой матрице.

В другом аспекте изобретение относится к способам детекции OX40L, где способы включают детектирование комплекса «OX40L-антитело к OX40L» в образце. Термин

45 «детекция», как используют в настоящем описании, включает качественную и/или количественную детекцию (измерение уровней) по сравнению с контролем или без него.

В другом аспекте изобретение относится к способам диагностики расстройства, связанного с экспрессией и/или активностью OX40L, где способы включают детектирование комплекса «OX40L-антитело к OX40L» в биологическом образце от

50 пациента, обладающего расстройством или подозреваемого в обладании им. В некоторых вариантах осуществления экспрессия OX40L представляет собой

повышенную экспрессию или патологическую (нежелательную) экспрессию.

В другом аспекте изобретение относится к любым антителам к OX40L, описанным в настоящей работе, где антитела к OX40L содержат детектируемую метку.

В другом аспекте изобретение относится к комплексу любого из описанных в
5 настоящей работе антител к OX40L и OX40L. В некоторых вариантах осуществления комплекс существует *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления антитела к OX40L метят детектируемой меткой.

10 Антитела к OX40L можно применять для детекции OX40L в любом из ряда хорошо известных способов детектирующего анализа. Например, биологический образец можно анализировать в отношении OX40L путем получения образца из требуемого источника, смешивания образца с антителами к OX40L, чтобы позволить антителам образовать комплекс антитело/OX40L с любым OX40L, присутствующим в смеси, и
15 детектирования любого комплекса антитело/OX40L, присутствующего в смеси. Биологический образец можно получать для анализа известными в данной области способами, которые подходят для конкретного образца. Способы смешивания образца с антителами и способы детектирования комплекса антитело/OX40L
20 выбирают согласно типу используемого анализа. Такие анализы включают иммуногистохимию, конкурентный и двухвалентный анализы и анализы стерического ингибирования.

Во всех аналитических способах для OX40L используют один или несколько из следующих реагентов: меченый аналог OX40L, иммобилизованный аналог OX40L,
25 меченые антитела к OX40L, иммобилизованные антитела к OX40L и стерические конъюгаты. Меченые реагенты также известны как «индикаторы».

Используемая метка представляет собой любую детектируемую активность, которая не препятствует связыванию OX40L и антител анти-OX40L. Многочисленные
30 метки известны для использования в иммуноанализе, где примеры включают компоненты, которые можно детектировать непосредственно, такие как флуорохром, хемилюминесцентные и радиоактивные метки, а также компоненты, такие как ферменты, которые должны прореагировать, или необходимо получить их производные для детекции. Примеры таких меток включают: радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C ,
35 ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люциферазы, например люциферазу светляка и бактериальную люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP),
40 щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например глюкозооксидазу, галактозооксидазу, и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, связанные с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления предшественника красителя, таким как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин,
45 спиновые метки, метки на основе бактериофагов, стабильные свободные радикалы и т.п.

Для ковалентного связывания этих меток с белками или полипептидами доступны общепринятые способы. Например, для мечения антител вышеописанными
50 флуоресцентными, хемилюминесцентными и ферментными метками можно использовать присоединяющие вещества, такие как диальдегиды, карбодиимиды, дималеинимиды, бис-имидаты, бис-диазотированный бензидин и т.п. Смотри, например, патенты США № 3940475 (флуориметрия) и 3645090 (ферменты); Hunter et

al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods, 40:219-230 (1981); и Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407-412 (1982). В настоящей работе предпочтительными метками являются ферменты, такие как пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза. Конъюгация такой метки, включая ферменты, с антителами является общепринятым способом манипуляции для обычного специалиста в способах иммуноанализа. Смотри, например, O'Sullivan et al., «Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay» в Methods in Enzymology, ed. JJ. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

Для определенных способов анализа необходима иммобилизация реагентов. Иммобилизация приводит к отделению антител анти-OX40L от любого OX40L, который остается свободным в растворе. Иммобилизацию общепринятым способом осуществляют или переводом в нерастворимую форму антител к OX40L или аналога OX40L перед процедурой анализа, как, например, адсорбцией на водонерастворимой матрице или поверхности (Bennich et al., U.S. 3720760), ковалентным связыванием (например, с использованием поперечной сшивки глутаральдегидом) или переводом в нерастворимую форму антител к OX40L или аналога OX40L впоследствии, например, иммунопреципитацией.

Экспрессию белков в образце можно исследовать с использованием способов иммуногистохимии и окрашивания. Показано, что иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей является надежным способом оценки или детектирования присутствия белков в образце. В способах иммуногистохимии («ИНС») используют антитела для связывания клеточных антигенов и их визуализации *in situ*, как правило, с помощью хромогенных или флуоресцентных способов. Для получения образца можно использовать образец ткани или клетки из млекопитающего (как правило, пациента, являющегося человеком). Образец можно получать множеством способов, известных в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров хирургическую резекцию, аспирацию или биопсию. Ткань может являться свежей или замороженной. В одном из вариантов осуществления образец фиксируют и заливают в парафи или т.п. Образец ткани можно фиксировать (т.е. сохранять) общепринятыми способами. Обычный специалист в данной области примет во внимание, что выбор фиксатора определяют, исходя из цели, для которой проводят гистологическое окрашивание или другой анализ образца. Обычный специалист в данной области также примет во внимание, что продолжительность фиксации зависит от размера образца ткани и используемого фиксатора.

ИНС можно осуществлять в сочетании с дополнительными способами, такими как морфологическое окрашивание и/или флуоресцентная гибридизация *in situ*. Доступны два основных способа ИНС: прямой и непрямой анализы. Согласно первому виду анализа связывание антител с антигеном-мишенью (например, OX40L) определяют непосредственно. В этом прямом анализе используют меченый реагент, такой как флуоресцентную метку или меченные ферментом первичные антитела, которые можно визуализировать без использования дополнительного взаимодействия антител. В типичном непрямом анализе неконъюгированные первичные антитела связываются с антигеном, и затем меченые вторичные антитела связываются с первичными антителами. Если вторичные антитела конъюгированы с ферментной меткой, то хромогенный или флюорогенный субстрат добавляют для обеспечения визуализации антигена. Амплификация сигнала происходит вследствие того, что несколько вторичных антител могут взаимодействовать с разными эпитопами на первичных

антителах.

Первичные и/или вторичные антитела, используемые для иммуногистохимии, как правило, метят детектируемой группой. Доступны многочисленные метки, которые можно, как правило, сгруппировать в следующие категории:

Независимо от способов получения образца, рассмотренных выше, может потребоваться дополнительная обработка среза ткани перед ИНС, в ходе или после нее. Например, можно осуществлять способы перевода эпитопа в нужное состояние, такие как прогревание образца ткани в цитратном буфере (смотри, например, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

После необязательной стадии забивки срез ткани подвергают воздействию первичных антител в течение достаточного периода времени и при подходящих условиях таким образом, что первичные антитела связываются с белковым антигеном-мишенью в образце ткани. Соответствующие условия для достижения этого можно определить при проведении общепринятых экспериментов. Степень связывания антител с образцом определяют с использованием любой из детектируемых меток, рассмотренных выше. Предпочтительно метка представляет собой ферментную метку (например, HRPO), которая катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, такого как хромоген 3,3'-диаминобензидина. Предпочтительно ферментную метку конъюгируют с антителами, которые связываются специфически с первичными антителами (например, первичные антитела представляют собой кроличьи поликлональные антитела, и вторичные антитела представляют собой козы антикроличьи антитела).

Таким образом полученные образцы можно подготовить для микроскопического исследования и накрыть покровным стеклом. Оценку микроскопического препарата затем осуществляют, например, с использованием микроскопа, и можно использовать критерии интенсивности окрашивания, которые используют в общепринятой практике.

Другие способы анализа, известные как конкурентный или двухвалентный виды анализа, являются общепринятыми, и их широко используют в коммерческом производстве диагностикумов.

Виды конкурентного анализа основаны на способности меченого аналога OX40L конкурировать с тестируемым OX40L в образце за ограниченное количество антигенсвязывающих участков на антителах к OX40L. Антитела к OX40L, как правило, переводят в нерастворимую форму перед проведением конкурентного анализа или после него и затем метку и OX40L, связанные с антителами к OX40L, отделяют от несвязавшихся метки и OX40L. Это отделение осуществляют декантированием (там, где участники связывания предварительно переведены в нерастворимую форму) или центрифугированием (там, где участника связывания преципитировали после конкурентной реакции). Количество тестируемого в образце OX40L обратно пропорционально количеству связанной метки, которое измеряют по количеству маркерного вещества. Получают кривые зависимости от дозы для известных количеств OX40L и сравнивают с результатами тестирования для количественного определения количества OX40L, присутствующего в тестируемом образце. Эти способы анализа называют системами ELISA, если в качестве детектируемых маркеров используют ферменты.

В другом виде конкурентного анализа, называемого «гомогенным» анализом, не требуется разделение фаз. В нем получают конъюгат фермента с OX40L и используют таким образом, что, когда антитела к OX40L связываются с OX40L, наличие антител к OX40L изменяет активность фермента. В этом случае OX40L или его

иммунологически активные фрагменты конъюгируют путем бифункционального органического мостика с ферментом, таким как пероксидаза. Конъюгаты селективируют для использования с антителами к OX40L таким образом, что связывание антител к OX40L ингибирует или стимулирует ферментативную активность метки. Этот способ, как таковой, широко используют под названием ЕМІТ.

Стерические конъюгаты используют в способах на основе стерических затруднений в гомогенном анализе. Эти конъюгаты синтезируют ковалентным связыванием низкомолекулярного гаптена с небольшим фрагментом OX40L таким образом, что антитела к гаптену, по существу, не способны связываться с конъюгатом одновременно с антителами к OX40L. В этом способе анализа OX40L, присутствующий в тестируемом образце, связывается с антителами к OX40L, таким образом позволяя антителам к гаптену связываться с конъюгатом, что приводит к изменению характеристики конъюгированного гаптена, например изменению флуоресценции, если гаптен представляет собой флуорофор.

Виды двухвалентного анализа, в частности, пригодны для определения OX40L или антител к OX40L. В последовательных видах двухвалентного анализа иммобилизованные антитела к OX40L используют для связывания с OX40L в тестируемом образце, тестируемый образец удаляют отмывкой, связанный OX40L используют для связывания со вторыми мечеными антителами к OX40L, и связавшиеся молекулы затем отделяют от несвязавшейся метки. Количество связанной метки прямо пропорционально количеству OX40L в тестируемом образце. В «одновременных» видах двухвалентного анализа тестируемый образец не отделяют перед добавлением меченых антител к OX40L. Последовательный двухвалентный анализ с использованием моноклональных антител к OX40L в качестве одних антител и поликлональных антител к OX40L в качестве других пригоден для тестирования образцов в отношении OX40L.

Вышеизложенное приведено только в качестве примеров анализов для детекции OX40L. Другие разработанные в настоящее время или в будущем способы, в которых применяют антитела к OX40L для определения OX40L, входят в объем настоящего изобретения, включая описанные здесь виды биоанализа.

Изделия

В другом варианте осуществления изобретение относится к изделию, содержащему вещества, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики описанных выше расстройств. Изделие содержит контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, объединенный с контейнером. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнер может быть образован из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или при сочетании с другой(ими) композицией(ями) является эффективной для лечения, профилактики и/или диагностики состояния и может обладать отверстием для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, обладающий пробкой, проницаемой для иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере, одно активное вещество в композиции представляет собой антитела по изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композицию используют для лечения конкретного состояния, такого как астма. Более того, изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит антитела по изобретению; и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией. Изделие в этом варианте осуществления изобретения может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, на

котором указано, что первую и вторую композиции с антителами можно применять для лечения конкретного состояния, например, астмы. Альтернативно или дополнительно изделие может содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может содержать другие необходимые с коммерческой и потребительской точки зрения материалы, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Далее следуют примеры способов и композиций по изобретению. Следует понимать, что можно применять различные другие варианты осуществления на основе представленного выше общего описания.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение мышинных моноклональных антител 8E12 и 13G5 против OX40L

Антитела к внеклеточной последовательности OX40L человека получали, как указано далее. Пять мышей Balb/c (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) гипериммунизировали рекомбинантным полипептидом OX40L-flag человека (внеклеточный домен лиганда OX40 человека, слитый с пептидом flag и экспрессируемый клетками CHO, Genentech, Inc., South San Francisco, CA) в адъюванте Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Осуществляли слияние В-клеток из мышей, обладающих высокими титрами антител к OX40L, с клетками миеломы мышей (pu1.Anan.22.4, Genentech, Inc., South San Francisco, CA). После нескольких суток супернатанты собирали и подвергали скринингу на продукцию антител посредством прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). IgG из сред для выращивания положительных клонов очищали аффинной хроматографией с протеином А (высокоскоростная белковая жидкостная хроматография Pharmacia (Pharmacia, Uppsala, Sweden)). Очищенные препараты антител стерилизовали фильтрованием (размер пор 0,2 мкм; Nalgene, Rochester NY) и хранили при 4°C в фосфатном буферном солевом растворе (PBS).

Анализы на основе проточной цитофлуориметрии осуществляли в средах для выращивания положительных в отношении ELISA клонов для скрининга на моноклональные антитела, которые конкурируют с рекомбинантным OX40R-Fc (рецептор OX40 человека, слитый с Fc-фрагментом IgG₁, экспрессируемый клетками CHO, Genentech, Inc.) за связывание с OX40L человека, экспрессируемым на клетках CHO. Клетки CHO-OX40L предварительно инкубировали с OX40R-Fc с последующим добавлением сред для выращивания. После инкубации клетки промывали в фосфатно-солевом буфере и затем окрашивали антимышиным IgG, конъюгированным с фикоэритрином, для детекции количества связанных мышинных моноклональных антител к OX40L человека. Определяли средний индекс флуоресценции (MFI). Моноклональные антитела (Mab), обозначенные как 8E12 и 13G5, обладали хорошими характеристиками в этих анализах.

Суммарную РНК экстрагировали из клеток гибридом, продуцирующих антитела 8E12 и 13G5, с использованием общепринятых способов. Варибельный домен легкой цепи (VL) и варибельный домен тяжелой цепи (VH) амплифицировали с использованием RT-PCR с вырожденными праймерами для тяжелой и легкой цепей, как указано далее. Прямые праймеры обладали специфичностью к N-концевой аминокислотной последовательности области VL и VH. Обратные праймеры для LC и HC конструировали так, чтобы они отжигались с областью в константном домене

легкой цепи (CL) и константном домене 1 тяжелой цепи (CH1) соответственно, которые являются высококонсервативными у разных видов. Амплифицированные области VL и VH клонировали в экспрессирующие векторы млекопитающих и полинуклеотидную последовательность вставок определяли с использованием
 5 общепринятых способов секвенирования. Аминокислотные последовательности VL и VH 8E12 представлены на фиг. 1. Аминокислотные последовательности VL и VH 13G5 представлены на фиг. 3.

Пример 2: Анализ ELISA связывания Mab 8E12 и 13G5 с белком OX40L

10 Конкурентный анализ ELISA проводили, как указано далее, для исследования связывания Mab 8E12 и 13G5 к OX40L с OX40L в растворе и для исследования связывания с экспрессируемым на клеточной поверхности OX40L. В некоторых экспериментах 96-луночные микролуночные планшеты maxiSorp (Nunc, Roskilde, Denmark) покрывали в течение ночи при 4°C антителами анти-FlagM2 из расчета 2
 15 мкг/мл (Sigma) в 50 mM карбонатном буфере, pH 9,6. Планшеты промывали PBS, содержащим 0,05% полисорбата-20, и забивали 0,5% бычьим сывороточным альбумином, 10 ч./млн Proclin-300 (Supelco, Bellefonte, PA) в PBS при комнатной температуре в течение 1 час. Планшеты промывали и добавляли 0,5 мкг/мл
 20 полипептида OX40L ECD-Flag человека. После инкубации в течение одного часа планшеты промывали. Добавляли смесь OX40-IgG-био человека и серийных разведений антител в PBS, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% полисорбата-20, 10 ч./млн Proclin 300. Планшеты инкубировали в течение 2 час при комнатной температуре и промывали. Связанный OX40-IgG-био человека
 25 детектировали добавлением стрептавидина-HRP (Amdex, Copenhagen, Denmark) с последующим добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) в качестве субстрата. Планшеты оставляли для развития окрашивания и реакцию останавливали добавлением 1 М фосфорной кислоты.
 30 Поглощение измеряли при 450 нМ на планшетном спектрофотометре Titertek (ICN, Costa Mesa, CA). Кривые титрования строили с использованием программы аппроксимации кривой четырехпараметрической регрессии (KaleidaGraph, программное обеспечение Synergy, Reading, PA). Mab 8E12 и 13G5 к OX40L связывали OX40L человека приблизительно с EC50 1,4 нМ и 1,1 нМ соответственно. В
 35 некоторых экспериментах анализ выполняли аналогично тому, как и выше, за исключением того, что планшеты для ELISA покрывали 0,5 мкг/мл OX40-IgG человека, смесь OX40-Flag человека и серийных разведений антител инкубировали на планшетах и связанный OX40-Flag человека детектировали с использованием антител
 40 анти-Flag-био с последующим добавлением стрептавидина-HRP. Mab 8E12 и 13G5 к OX40L связывали OX40L человека приблизительно с EC50 1,9 нМ и 0,46 нМ соответственно.

В других экспериментах клетки CHO, экспрессирующие полноразмерный OX40L человека, выращивали в среде 50:50 F12/DMEM с добавлением 2 mM L-глутамина, 100
 45 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (среда с добавками) и 5% FBS (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) (среда для выращивания) во влажном инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. Клетки отделяли от культуральных планшетоов с использованием Accutase (ICN) и добавляли в 96-луночные микролуночные планшеты
 50 из расчета 300000 клеток/лунка. Смесь OX40-IgG человека и серийных разведений антител в среде для выращивания добавляли в планшеты. После инкубации в течение одного часа на льду клетки промывали путем центрифугирования планшетоов и удаления супернатанта. Связанный OX40-IgG человека детектировали с

использованием анти-Fc-HRP. Определенные EC50 составляли 20 и 130 нМ для 8E12 и 13G5 соответственно. В некоторых экспериментах OX40-IgG-bio человека использовали вместо OX40-IgG человека. Связанный OX40-IgG-bio человека детектировали с использованием стрептавидина-HRP. Развитие цветной реакции в планшетах и измерение осуществляли, как описано выше. Mab 8E12 и 13G5 связывались с OX40L человека приблизительно с EC50 около 11 нМ и 60 нМ соответственно.

В этих анализах показали, что Mab 8E12 и 13G5 связываются с OX40L человека в растворе и с OX40L человека, экспрессированным на клетках CHO.

Для определения того, связываются ли Mab 8E12 и 13G5 с OX40L мыши, планшеты для ELISA покрывали OX40L мыши. Добавляли серийные разведения 8E12 или 13G5 (0,004-4 мкг/мл). Для детекции использовали козий антимышиный Fc-HRP. Наблюдали отсутствие связывания. В другом варианте планшеты для ELISA покрывали 8E12 или 13G5. Добавляли серийные разведения OX40L-Flag мыши. Для детекции использовали биотинилированные анти-Flag с последующим добавлением стрептавидина-HRP. Наблюдали отсутствие связывания.

Пример 3: Анализ Mab 8E12 и 13G5 с использованием поверхностного плазмонного резонанса

Кинетику связывания мышиных антител к OX40L с OX40L человека измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Pharmacia BIAcore® 3000 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden) при комнатной температуре (Karlsson et al., 1994; Morton & Myszk, 1998). Антитела анти-Flag (анти-FlagM2, Sigma, St. Louis, MO) иммобилизовали на сенсорном чипе (CM5) посредством первичных аминогрупп. Высокую скорость течения использовали с целью минимизации эффектов массообмена. Карбоксиметилированную поверхностную матрицу сенсорного чипа активировали инъекцией 20 мкл смеси 0,025 М N-гидроксисукцинимиды и 0,1 М N-этил-N'-(диметиламинопропил)карбодиимида при 5 мкл/мин. 7 мкл 50 мкг/мл анти-Flag в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, инъецировали при 5 мкл/мин два раза. После присоединения незанятые участки на чипе блокировали инъекцией 20 мкл 1 М этаноламина, pH 8,5. Рабочий буфер представлял собой PBS, содержащий 0,05% полисорбата-20. 5 мкл 4 мкг/мл OX40L-Flag инъецировали при 30 мкл/мин для связывания OX40-Flag с анти-Flag на чипе. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения (6,2-50 нМ) мышиных антител к OX40 человека 8E12 (PUR 9333) и 13G5 (PUR 9306) в рабочем буфере инъецировали в проточную кювету в течение 2 минут при скорости течения 30 мкл/мин и давали возможность связанным антителам к OX40L диссоциировать в течение 20 минут. Поверхность связывания регенерировали инъекцией 30 мкл 10 мМ глицина-HCl (pH 1,5). Проточную кювету, которая содержала иммобилизованные антитела анти-Flag, но в нее не добавляли OX40L-Flag, использовали в качестве контрольной кюветы. Данные анализировали с использованием модели связывания 1:1 с использованием глобальной аппроксимации. Константы скорости ассоциации и диссоциации аппроксимировали одновременно (программное обеспечение BIAevaluation).

Кажущиеся константы скорости ассоциации составляли $2,6 \times 10^6$ и $4,8 \times 10^5$ (1/Ms) для IgG-антител 8E12 и 13G5 соответственно. Вследствие очень медленной кинетики скорости диссоциации константы скорости диссоциации невозможно было определить ($< 5 \times 10^6$ /s). Вычисленные кажущиеся величины K_d составляли $< 0,019$ нМ и $< 0,010$ нМ для IgG-антител 8E12 и 13G5 соответственно.

Пример 4: Антитела к OX40L 8E12 и 13G5 распознают разные детерминанты

связывания на OX40L

Эксперименты по связыванию Скэтчарда осуществляли для определения того, конкурируют ли mAb к OX40L 8E12 и 13G5 друг с другом за связывание со сходными или перекрывающимися эпитопами на OX40L человека, экспрессируемого на

5 клетках CHO, и для определения аффинности связывания антител. 50 мкг мышинных моноклональных антител к OX40L 8E12 и 13G5 подвергали йодированию с использованием общепринятого способа с лактопероксидазой. Антитела 8E12 и 13G5 серийно разводили 1:4 в буфере для сред (F12:DMEM Дульбекко, 1% бычий

10 сывороточный альбумин, 0,05% азид натрия и 25 мМ буфер Hepes, pH 7,2), начиная от начальной концентрации 200 нМ. Осуществляли два набора серийных разведений (50 мкл) в двух параллелях в 96-микролуночном планшете. Из каждого набора разведений в лунки вносили 50 мкл йодированного или 8E12, или 13G5 (конечная концентрация 0,25 нМ). Содержимое планшета перемешивали и затем суммарную

15 смесь переносили в 96-луночный планшет для культуры тканей, содержащий 30000 OX40L-экспрессирующих клеток CHO на лунку, которые высевали на планшет в предыдущие сутки. Планшеты накрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующие сутки жидкость из лунок (содержащих клетки) отсасывали и лунки дважды

20 промывали буфером для сред. 200 мкл 1N NaOH добавляли в каждую лунку для лизирования клеток, встряхивали в течение 10 минут и затем переносили 96-луночный штатив для микропробирок. Для каждой пробирки подсчитывали количество импульсов в сцинтилляционном гамма-счетчике Wallac. Количества импульсов с соответствующими им концентрациями антител вносили программу анализа

25 Скэтчарда New Ligand для нанесения на график количества связанных антител относительно соотношения связанных/свободных и для определения аффинности связывания и концентрации рецептора. Для конкурентных экспериментов данные собирали и наносили на график с использованием Kaleidagraph. Кривые вычерчивали с использованием 4-параметрической аппроксимации.

30

Mab 8E12 связывались с OX40L человека с K_d 0,92 нМ. Mab 13G5 связывались с OX40L человека с K_d 1,09 нМ. 8E12 и 13G5 не конкурировали друг с другом за связывание с OX40L, экспрессируемого на клетках CHO, что указывает на то, что моноклональные антитела к OX40L 8E12 и 13G5 распознают разные детерминанты

35 связывания на OX40L человека.

Пример 5: Антитела к OX40L ингибируют взаимодействие OX40L человека и OX40 человека

Эксперименты по конкурентному связыванию осуществляли для определения того, конкурируют ли mAb к OX40L 8E12 и 13G5 с йодированным OX40-Fc (внеклеточным доменом рецептора OX40, слитым с Fc-доменом) за связывание с OX40L,

40 экспрессируемым на клетках CHO. 50 мкг лиганда OX40L-Fc подвергали йодированию с использованием общепринятого способа с лактопероксидазой. Антитела 8E12 и 13G5 серийно разводили 1:4 в буфере для сред (F12:DMEM Дульбекко, 1% бычий

45 сывороточный альбумин, 0,05% азид натрия и 25 мМ буфер Hepes, pH 7,2), начиная от начальной концентрации 200 нМ. Разведения (50 мкл) осуществляли в двух параллелях в 96-микролуночном планшете. В каждую лунку вносили 50 мкл йодированного OX40L-Fc (конечная концентрация 0,25 нМ), перемешивали и затем

50 суммарную смесь переносили в 96-луночный планшет для культуры тканей, содержащий 30000 OX40L-экспрессирующих клеток CHO на лунку, которые высевали на планшет в предыдущие сутки. Планшеты накрывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующие сутки жидкость из лунок (содержащих клетки)

отсасывали и лунки дважды промывали буфером для сред. 200 мкл 1N NaOH добавляли в каждую лунку для лизирования клеток, встряхивали в течение 10 минут и затем переносили 96-луночный штатив для микропробирок. Для каждой пробирки подсчитывали количество импульсов в сцинтилляционном гамма-счетчике Wallac.

Данные собирали и наносили на график с использованием Kaleidagraph. Кривые вычерчивали с использованием 4-параметрической аппроксимации.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 3. Mab 8E12 (светлые треугольники) и 13G5 (темные квадраты) конкурировали с рецептором OX40 за связывание с OX40L, экспрессируемым на клетках CHO, указывая на то, что антитела ингибируют связывание рецептора OX40 человека с OX40L человека.

Пример 6: Обработка антителами к OX40L ингибирует пролиферацию Т-клеток в клеточном анализе

Анализ реакции смешанных лимфоцитов (MLR) осуществляли для определения того, ингибирует ли пролиферацию Т-клеток блокирование взаимодействия OX40L-OX40 посредством mab к OX40L. В этом клеточном эксперименте анализируют способность антител к OX40L ингибировать опосредованную OX40L передачу сигнала. В кратком изложении, плазмцитойдные дендритные клетки (pDC) выделяли из крови человека с использованием бус BDCA-4 MACS согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec). Клетки помещали из расчета 1×10^6 клеток/мл в среду, содержащую RPMI/10% эмбриональную бычью сыворотку/2 mM L-глутамин, и стимулировали в течение 3 суток посредством 2,5 мкг/мл растворимого белка CD40L человека (R & D Systems) и 10 нг/мл белка IL-3 человека (R & D Systems) с целью активации pDC. Активированные pDC затем промывали три раза фосфатно-буферным солевым раствором/3% эмбриональной бычьей сывороткой, затем совместно культивировали с «наивными» Т-клетками CD45RA+, которые выделяли из крови человека с использованием бус MACS согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec). Совместную культуру высевали, исходя из соотношения pDC:Т-клетки 1:200, из расчета 1×10^5 Т-клеток на лунку, в 96-луночный планшет с U-образным дном на 1 неделю в присутствии указанных реагентов. Осуществляли пульсовое мечение клеток посредством 1 мкКи метилтритированного тимидина на лунку в течение последних 6 часов культивирования, собирали на фильтровальные планшеты и подсчитывали количество импульсов.

Результаты двух постановок экспериментов, обозначенных как «dnrl» и «dnr2», представлены на фиг. 4. Обработка каждым из mab к OX40L 8E12 (светлые квадраты) и mab к OX40L 13G5 (светлые круги) значительно ингибировала пролиферацию Т-клеток, указывая на то, что оба вида антител ингибируют опосредованную OX40L передачу сигнала. В то же время контрольный мышиный IgG1 (крестики) не ингибировал пролиферацию Т-клеток. Контрольные уровни пролиферации Т-клеток показаны светлыми ромбами, и контрольные уровни пролиферации Т-клеток, смешанных с активированными клетками, показаны темными квадратами. Величина IC50 для ингибирования пролиферации Т-клеток посредством mab к OX40L варьировала от донора к донору в диапазоне от 0,5 до 10 нМ.

Пример 7: Обработка антителами к OX40L ингибирует выработку IL-2 Т-клетками памяти

Выработку IL-2 Т-клетками памяти анализировали для определения того, ингибирует ли блокирование взаимодействия OX40L-OX40 посредством mab к OX40L выработку IL-2. В этом эксперименте тестируют способность антител к OX40L ингибировать опосредованную OX40L передачу сигнала. В кратком изложении, Т-

клетки памяти CD45RO+ выделяли из крови человека с использованием бус MACS согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec). Клетки помещали из расчета 1×10^6 клеток/мл в среду, содержащую RPMI/10% эмбриональную бычью сыворотку/2 мМ L-глутамин, и стимулировали в течение 16 часов посредством 1 мкг/мл антител анти-CD3 (BD Pharmingen) и 10 нМ растворимого белка OX40L человека (R & D Systems). Антитела к OX40L или контрольные антитела mIgG1 добавляли в указанных концентрациях. Уровни IL-2 в супернатантах измеряли с использованием набора для ELISA согласно инструкциям производителя (R & D Systems).

Результаты двух постановок экспериментов, обозначенных как «dnr5» и «dnr6», представлены на фиг. 5. Обработка каждым из mab 8E12 (светлые квадраты) и mab 13G5 (светлые круги) значительно ингибировала выработку IL-2 Т-клетками памяти. В то же время добавление контрольного мышиного IgG1 (крестики) не ингибировало выработку IL-2. Уровни выработки IL-2 Т-клетками памяти при обработке только антителами анти-CD3 показано заштрихованными квадратами, при обработке антителами анти-CD3 и OX40L человека показано темными квадратами, или Т-клетки памяти без обработки показаны светлыми ромбами.

Пример 8: Обработка антителами к OX40L ингибирует выживаемость активированных Т-клеток

Выживаемость активированных Т-клеток анализировали для определения того, ингибирует ли блокирование взаимодействия OX40L-OX40 посредством mab к OX40L выживаемость. В этом клеточном эксперименте анализируют способность антител к OX40L ингибировать опосредованную OX40L передачу сигнала. В кратком изложении, плазмцитойдные дендритные клетки (pDC) выделяли из крови человека с использованием бус BDCA-4 MACS согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec). Клетки помещали из расчета 1×10^6 клеток/мл в среду, содержащую RPMI/10% эмбриональную бычью сыворотку/2 мМ L-глутамин, и стимулировали в течение 3 суток посредством 2,5 мкг/мл растворимого белка CD40L человека (R & D Systems) и 10 нг/мл белка IL-3 человека (R & D Systems). Активированные pDC CD123+BDCA2-затем отбирали с помощью FACS и совместно культивировали с активированными Т-клетками. Т-клетки выделяли путем отрицательной селекции из крови человека с использованием бус MACS согласно инструкциям производителя (Miltenyi Biotec) и активировали в течение 3 суток посредством 0,1 мкг/мл анти-CD3/1 мкг/мл анти-CD28 (BD Pharmingen). Совместную культуру высевали в соотношении pDC:Т-клетки 1:50, исходя из 1×10^6 Т-клеток на мл, в 6-луночный планшет в присутствии указанных реагентов (в концентрациях 1 нМ или 10 нМ). Количество клеток анализировали с течением времени исключением трипанового синего.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 6. Обработка посредством каждым из mab к OX40L 8E12 (светлые квадраты) и mab к OX40L 13G5 (светлые круги) значительно ингибировала выживаемость активированных Т-клеток. В то же время добавление контрольного мышиного IgG1 («mIgG1»; крестики) не ингибировало выживаемость активированных Т-клеток. Контрольные необработанные Т-клетки («нестимулированные») показаны светлыми ромбами, и контрольные Т-клетки с активированными pDC («активированные pDC») показаны темными квадратами.

Хотя вышеописанное изобретение довольно подробно описано посредством приведения иллюстраций и примеров с целями ясного понимания, описания и примеры не следует интерпретировать как ограничивающие объем изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело к OX40L, содержащее:

(а) легкую цепь, содержащую (i) HVR-L1, содержащую последовательность RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1) или RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2); (ii) HVR-L2, содержащую последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO:3) или KVSNRFS (SEQ ID NO:4); и (iii) HVR-L3, содержащую последовательность FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5) или SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6); и

(b) тяжелую цепь, содержащую (i) HVR-H1, содержащую последовательность SYWLN (SEQ ID NO:7) или SYWMH (SEQ ID NO:8); (ii) HVR-H2, содержащую последовательность MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9) или EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10); и (iii) HVR-H3, содержащую последовательность GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11) или ERSPRYFDV (SEQ ID NO:12),

где антитело к OX40L связывается с OX40L человека.

2. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит:

(а) легкую цепь, содержащую (i) HVR-L1, содержащую последовательность RSSQSIVHGNGNTYLE (SEQ ID NO:1); (ii) HVR-L2, содержащую последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO:3); и (iii) HVR-L3, содержащую последовательность FQGSHVPYT (SEQ ID NO:5); и

(b) тяжелую цепь, содержащую (i) HVR-H1, содержащую последовательность SYWLN (SEQ ID NO:7); (ii) HVR-H2, содержащую последовательность MIDPSDSETHYNQVFKD (SEQ ID NO:9); и (iii) HVR-H3, содержащую последовательность GRGNFYGGSHAMEY (SEQ ID NO:11).

3. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит:

(а) легкую цепь, содержащую (i) HVR-L1, содержащую последовательность RSSQSPVHSNGNTYLH (SEQ ID NO:2); (ii) HVR-L2, содержащую последовательность KVSNRFS (SEQ ID NO:4); и (iii) HVR-L3, содержащую последовательность SQSTHIPWT (SEQ ID NO:6); и

(b) тяжелую цепь, содержащую (i) HVR-H1, содержащую последовательность SYWMH (SEQ ID NO:8); (ii) HVR-H2, содержащую последовательность EIDPSNGRTNYNEKFKS (SEQ ID NO:10); и (iii) HVR-H3, содержащую последовательность ERSPRYFDV (SEQ ID NO:12).

4. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:

DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNTYLEWHLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKINRVEAEDLGVIYCFQGSHVPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:13).

5. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWLNWVKQRPQGQGLEWIVMIDPSDSETHYNQVFKDKATL
TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCIRGRGNFYGGSHAMEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 15).

6. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит:

(а) вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:

DILMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHGNGNTYLEWHLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKINRVEAEDLGVIYCFQGSHVPYTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:13);

и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWLNWVKQRPQGQGLEWIVMIDPSDSETHYNQVFKDKATL
TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCIRGRGNFYGGSHAMEYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 15).

7. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:

DIVMTQTPLSLPVS LGDQASMYCRSSQSPVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:14).

8. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYSFTSYWMHGVQRPGQGLEWIGEIDPSNGRTNYNEKFKSKATL
TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRERSPRYFDVWGAGTTLTVSS (SEQ ID NO:16).

9. Антитело к OX40L по п.1, где антитело содержит:

(a) вариабельный домен легкой цепи, обладающий последовательностью:

DIVMTQTPLSLPVS LGDQASMYCRSSQSPVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:14);

и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи, обладающий последовательностью:

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYSFTSYWMHGVQRPGQGLEWIGEIDPSNGRTNYNEKFKSKATL
TVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRERSPRYFDVWGAGTTLTVSS (SEQ ID NO:16).

10. Антитело по любому из пп.1-3, 6 и 9, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

11. Антитело по любому из пп.1-3, 6 и 9, где антитело выбрано из группы, состоящей из химерного антитела, гуманизированного антитела, аффинно-зрелого антитела, антитела человека и биспецифического антитела.

12. Антитело по любому из пп.1-3, 6 и 9, где антитело представляет собой фрагмент антитела.

13. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-3, 6 и 9.

14. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.13.

15. Клетка-хозяин, способная экспрессировать экзогенную нуклеиновую кислоту, содержащая вектор по п.14.

16. Клетка-хозяин по п.15, где клетка-хозяин является прокариотической.

17. Клетка-хозяин по п.15, где клетка-хозяин является эукариотической.

18. Клетка-хозяин по п.15, где клетка-хозяин является клеткой млекопитающего.

19. Способ получения антител к OX40L, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело по любому из пп.1-3, 6 и 9, так что нуклеиновая кислота экспрессируется.

20. Способ по п.19, где клетка-хозяин является прокариотической.

21. Способ по п.19, где клетка-хозяин является эукариотической.

22. Способ лечения или профилактики иммунного расстройства, причем способ включает введение эффективного количества антитела к OX40L по любому из пп.1-3, 6 и 9 субъекту, нуждающемуся в таком лечении.

23. Способ по п.22, где иммунное расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство.

24. Способ по п.22, где иммунное расстройство представляет собой астму, атопический дерматит, аллергический ринит, воспалительное заболевание кишечника, заболевание «трансплантат против хозяина», рассеянный склероз или системную красную волчанку.

25. Способ по п.24, где иммунное расстройство представляет собой астму, атопический дерматит или аллергический ринит.

26. Способ по п.19, дополнительно включающий выделение антитела из культуры

клетки-хозяина.

27. Способ по п.26, где антитело выделяют из среды культивирования клетки-хозяина.

5 28. Способ по п.26, дополнительно включающий комбинирование выделенного антитела с фармацевтически приемлемыми носителем или эксципиентом для приготовления фармацевтического состава, содержащего антитело.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Список последовательностей

<110> Flavius Martin

<120> **АНТИТЕЛА К ОХ40L И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

<130> P2214R1

<150> US 60/751,377

<151> 2005-12-16

<160> 16

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1			5			10			15					

Glu

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1			5			10			15					

His

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
			5			

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Ile Pro Trp Thr

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ser Tyr Trp Leu Asn

5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Ser Tyr Trp Met His

5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Val Phe

1

5

10

15

Lys Asp

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Glu Ile Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Ser

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11
 Gly Arg Gly Asn Phe Tyr Gly Gly Ser His Ala Met Glu Tyr
 5 10

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Glu Arg Ser Pro Arg Tyr Phe Asp Val
 5

<210> 13
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15

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

His Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp His Leu Gln Lys Pro
 35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Met Tyr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Pro Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 15
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Tyr Trp Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Val Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
50 55 60

Asn Gln Val Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Arg Gly Arg Gly Asn Phe Tyr Gly
95 100 105

Gly Ser His Ala Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

Ser Tyr Trp Met His Gly Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

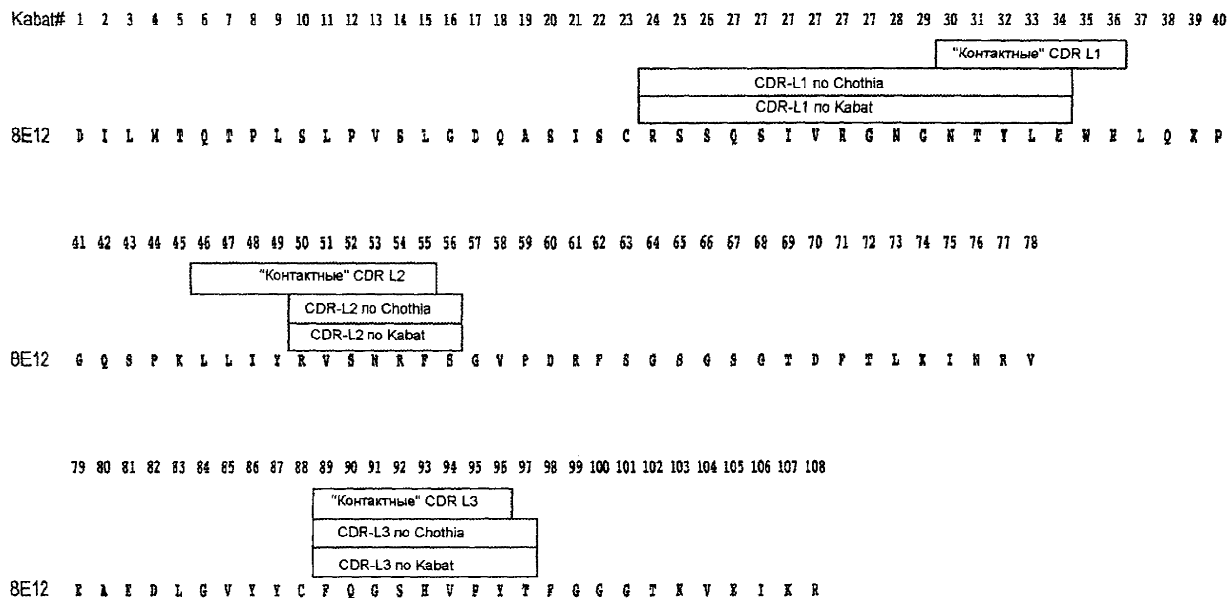
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

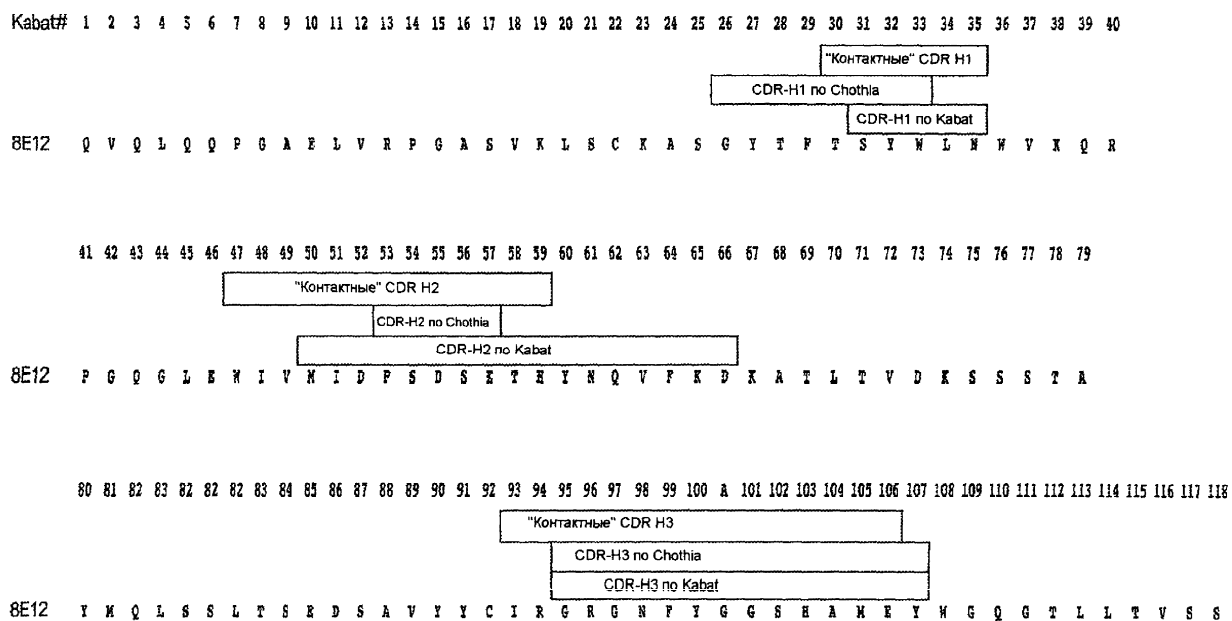
Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Glu Arg Ser Pro Arg Tyr Phe
95 100 105

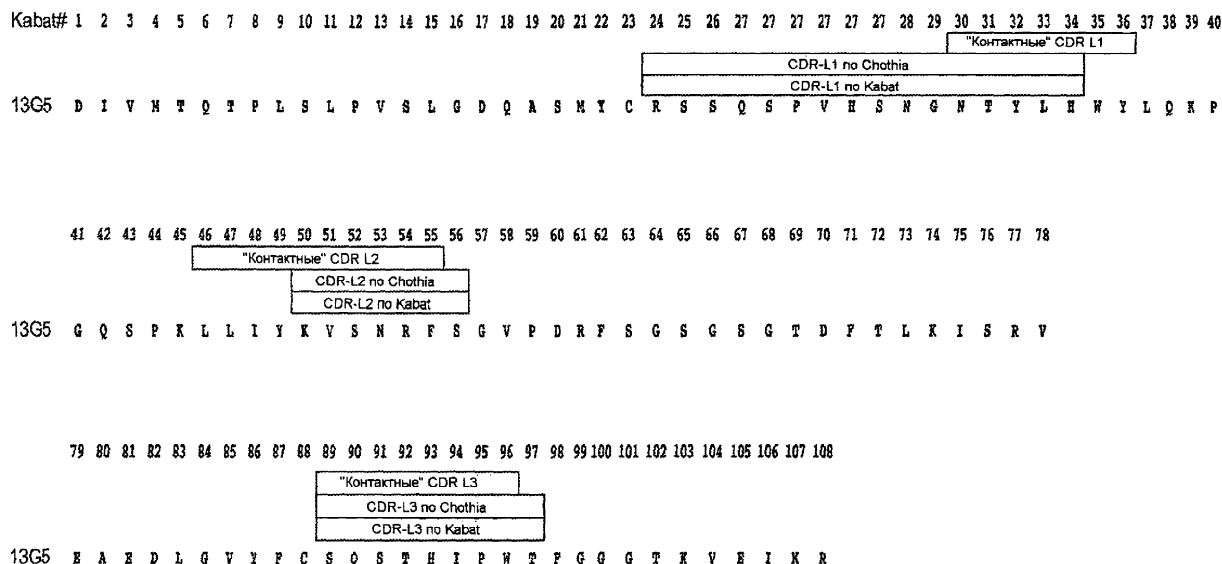
Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110 115



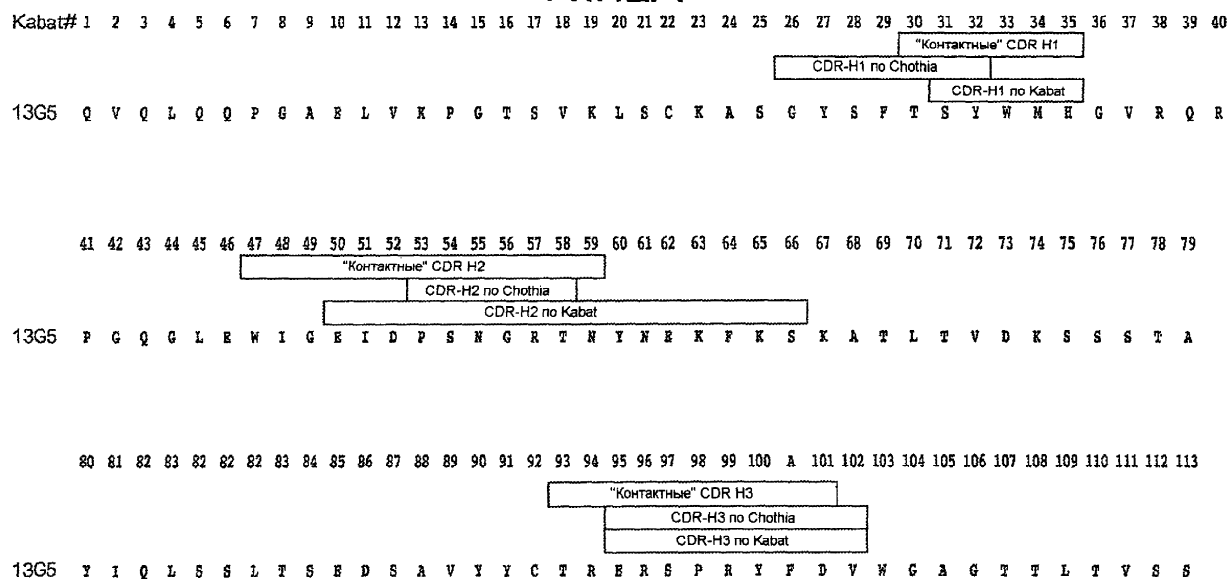
Фиг.1А



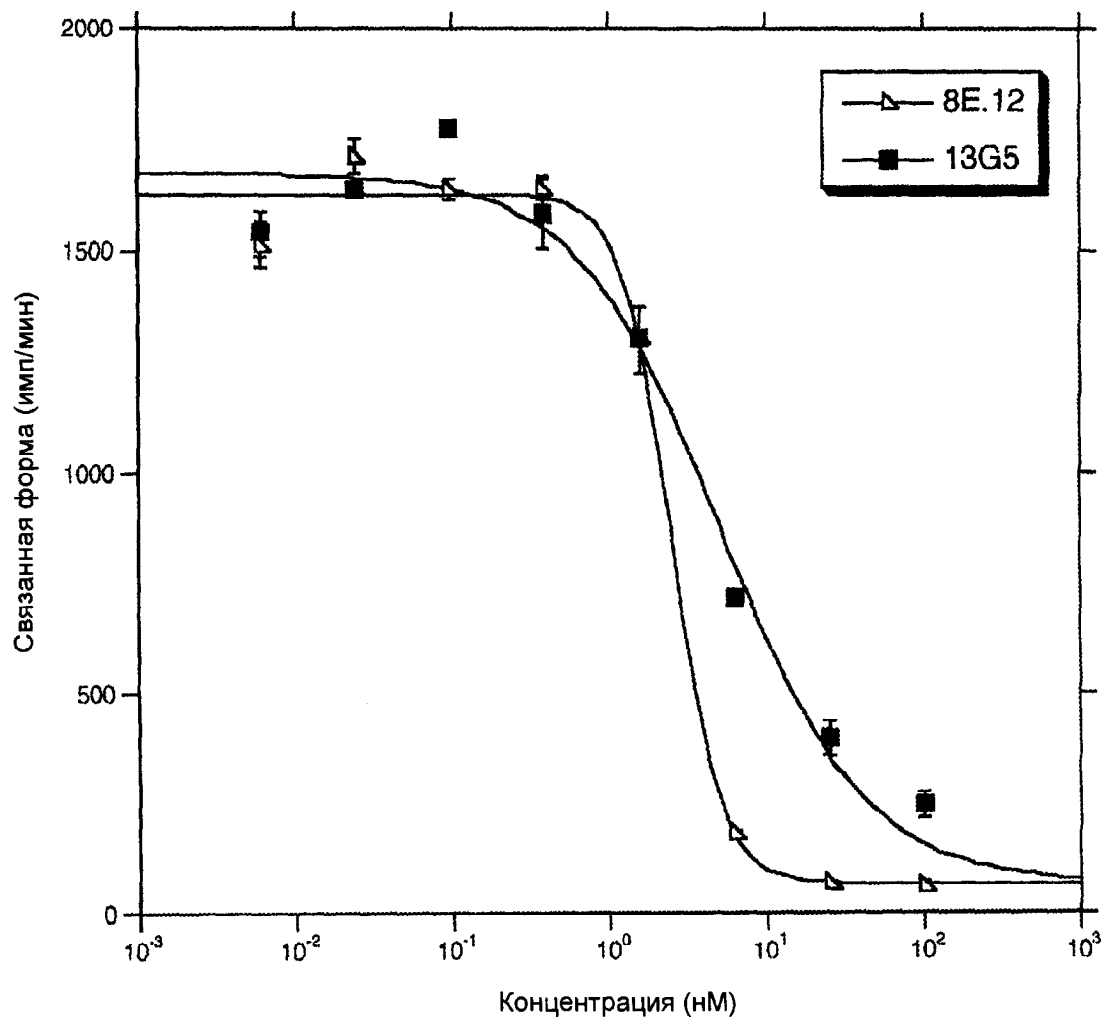
Фиг.1В



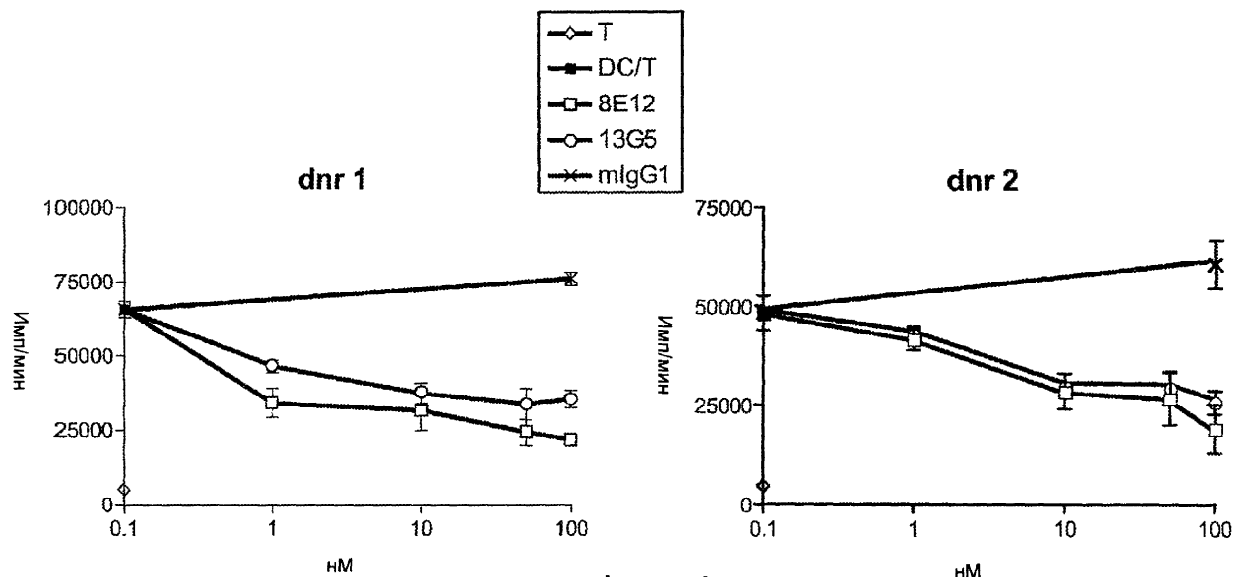
Фиг.2А



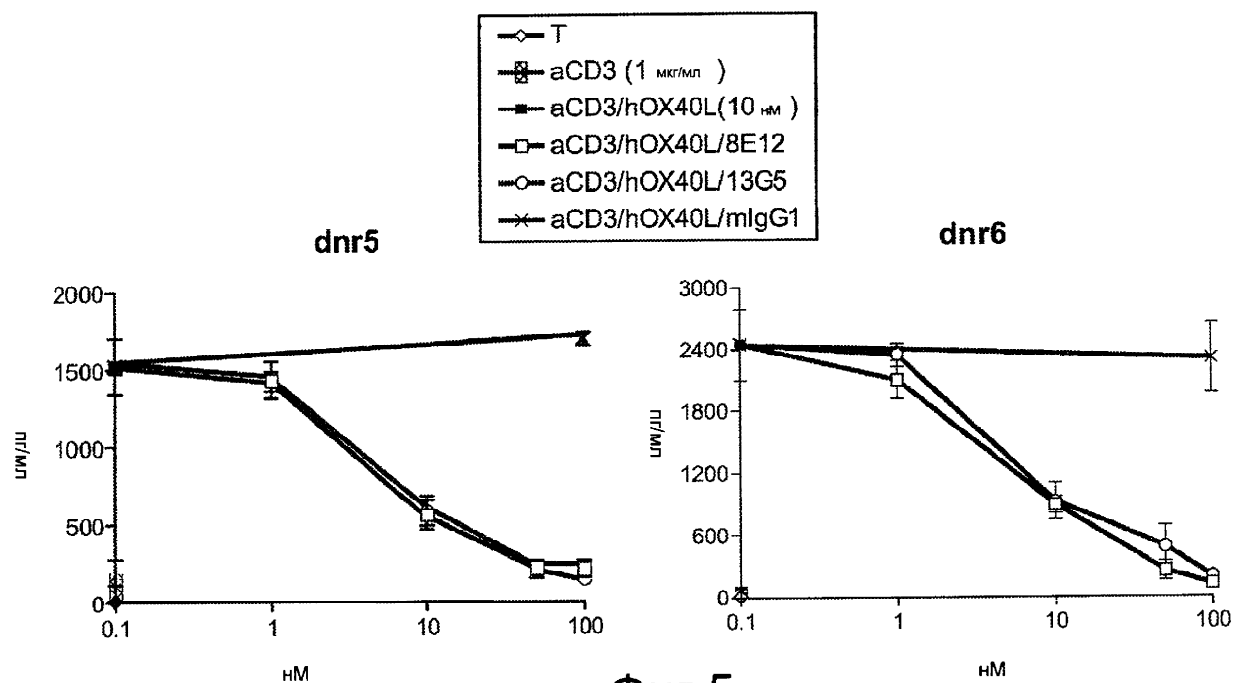
Фиг.2В



Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5