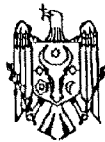




MD 4612 C1 2019.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4612** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2017 0082 (22) Data depozit: 2012.09.13 (31) Nr.: 1116092.6 (32) Data: 2011.09.16 (33) Țara: GB (41) Data publicării cererii: 2018.02.28, BOPI nr. 2/2018	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019 (62) Divizată din cererea: Nr.: a 2014 0039 Data: 2014.04.11 (85) 2014.04.11 (86) PCT/GB2012/052268, 2012.09.13 (87) WO 2013/038191 A3, 2013.03.21
(71) Solicitant: BIOCEROX PRODUCTS B.V., NL (72) Inventatori: SIMONS Petrus Johannes, NL; BOON Louis, NL (73) Titular: BIOCEROX PRODUCTS B.V., NL (74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila	

(54) Anticorpi anti-CD134 (OX40) și aplicarea acestora

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la anticorpi care se leagă specific la CD134 uman.

Anticorpii anti-CD134 umani, conform invenției, se leagă specific la domeniul extracelular al CD134 uman, inclusiv la alte domenii de legare decât cel de legare a ligandului OX40 (OX40L) la CD134 uman, care este exprimat, de exemplu, pe limfocitele T efectoare (Teff) CD4 și/sau CD8 umane activate convențional și pe limfocitele T CD4

2

reglatoare (Treg) supresoare umane activate. Anticorpii anti-CD134 umani din invenție pot fi utilizați (de exemplu, pentru stimularea activității anticanceroase a Teff și/sau inhibarea funcției de supresie a Treg) pentru tratamentul cancerului.

Secvențe: 61

Revendicări: 29

Figuri: 23

MD 4612 C1 2019.08.31

(54) Anti-CD134 (OX40) antibodies and uses thereof**(57) Abstract:**

1
The invention provides antibodies that specifically bind to human CD134.

Invention anti-human CD134 antibodies specifically bind to the extracellular domain of human CD134, including non-OX40 ligand (OX40L) binding domains on human CD134, which is expressed on e.g. activated human conventional effector CD4 and/or CD8 T lymphocytes (Teffs) and on activated human

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

Sequences: 61

Claims: 29

Fig.: 23

(54) Анти-CD134 антитела (OX 40) и их применение**(57) Реферат:**

1
Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с человеческими CD134.

Человеческие антитела анти-CD134, согласно изобретению, специфически связываются с внеклеточным доменом человеческого CD134, в том числе с другими связывающими доменами, отличающимися от связывающего домена лиганда OX40 (OX40L) к человеческому CD134, выраженного, например, на эффекторных CD4 и/или CD8 Т-лимфоцитах (Teff), условно

2
активированных и на CD4 регуляторных (Treg) супрессивных активированных Т-лимфоцитах. Человеческие антитела анти-CD134, согласно изобретению, могут быть использованы (например, для стимулирования противоопухолевой активности Teff и/или ингибирования супрессивной функции Treg) для лечения рака.

Последовательности: 61

П. формулы: 29

Фиг.: 23

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

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

Stimularea funcției antitumorale a celulelor T reprezintă o abordare unică în tratamentul cancerului. Există dovezi importante, conform cărora celulele tumorale "evită" sistemul imunitar prin inducerea unei toleranțe imune active, mediate în mare măsură de limfocitele T reglatoare (Tregs, Quezda et al. Immunol. Rev., 2011, 241, p. 104-118). Prin urmare, echilibrul dintre T-limfocitele efectoare (adică eradicarea directă sau indirectă a celulelor tumorale) Teff și tolerogene (adică supresia funcțiilor efectoare și supraviețuirii Teff) Treg pare a fi crucial pentru eficiența imunoterapiei antitumorale. Cu alte cuvinte, un răspuns imun antitumoral eficient poate fi obținut prin creșterea funcției efectoare a Teff specifice tumorii și/sau prin atenuarea funcției supresoare a Treg specifice tumorii. Un receptor - cheie, care a fost demonstrat să medieze aceste răspunsuri, este receptorul CD134 (OX40) (Sugamura K., Ishii N., Weinberg A. Therapeutic targeting of the effector T- cell co-stimulatory molecule OX40. Nature Rev. Imm., 2004, 4, p. 420-431).

CD134 (de asemenea cunoscut ca OX40, TNFRSF4 și ACT35) este un membru al superfamiliei receptorului factorului de necroză tumorală. Acest receptor co-stimulator de suprafață CD134 este exprimat pe limfocitele T activate și joacă un rol important în supraviețuirea și funcția acestora. Prezența limfocitelor T care exprimă CD134 a fost demonstrată în diferite tumori maligne umane și în ganglionii limfatici regionali ai pacienților cu cancer (Ramstad et al. Am. J. Surg., 2000, 179, p. 400-406; Vetto et al. Am. J. Surg. 1997, 174, p. 258-265).

Ligarea *in vivo* a receptorului CD134 la șoareci (fie prin proteine solubile de fuziune ale ligandului OX40 (OX40L) cu imunoglobulina la șoareci, fie prin mimetice OX40L la șoareci, cum ar fi anticorpii specifici anti-CD134 la șoareci) în cazul șoarecilor purtători de tumori sporește imunitatea antitumorală, conducând la supraviețuire în lipsa tumorii la modelele murine pe diferite linii celulare tumorale maligne, de exemplu, în caz de limfom, melanom, sarcom, cancer de colon, cancer mamar și gliom (Sugamura et al. Nature Rev. Imm. 2004, 4, p. 420-431).

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

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

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

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

În prezent, în mod surprinzător s-a relevat că, pentru a induce activitatea antitumorală mediată de celulele T, utilizarea moleculelor izolate de adeziune, care se leagă la CD134 uman, unde molecula de adeziune nu împiedică legarea receptorului uman CD134 (CD134) la ligandul OX40 (OX40L), are drept rezultat un răspuns imun crescut, caracterizat prin intensificarea funcției imunostimulatoare/efectoare a celulelor T-efectoare și/sau prin proliferarea acestor celule, și/sau prin fenomenul de reglare cu reducere în cazul funcției imunosupresoare a celulelor T reglatoare.

Astfel, prezenta invenție se referă la moleculele izolate de adeziune, care se leagă la CD134 uman, și molecula de adeziune nu împiedică legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L).

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

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

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

Prezenta invenție se referă în continuare la molecule de acid nucleic, care codifică o secvență aminoacidică a unei molecule de adeziune, la vectori care conțin asemenea acizi nucleici, la celule gazdă care cuprind vectori și la metode de preparare a moleculelor de adeziune.

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

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-23, care reprezintă:

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

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

fig. 3 - caracteristicile adeziunii clonei ACT35, clonei 12H3 și clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate.

fig. 4 - legarea clonei 12H3 și clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T CD4, care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate și pe limfocitele T CD8.

fig. 5 - competiția încrucișată a clonei 12H3 sau clonei 20E5 nemarcate a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu clona ACT35 comercializată a anticorpilor anti-CD134 de șoarece, conjugată cu PE cu sau clona L106 pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate.

fig. 6 - legarea simultană a clonei 12H3 sau clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu OX40L uman pe limfocitele T, care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate.

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

fig. 8 - efectul dozo-dependent al expunerii la clona 12H3 sau clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece, sau la OX40L uman, asupra proliferării de limfocite T, care exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate.

fig. 9 - efectul combinării clonei 12H3 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu OX40L uman sau clonei 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu OX40L uman asupra proliferării de limfocite T, ce exprimă CD134 uman, PHA-M - stimulate.

fig. 10 - efectul expunerii la clona 12H3 sau clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece, sau la OX40L uman, asupra proliferării de limfocite T efectoare umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimulatorie ale anticorpilor anti-CD3 uman/anti-CD28 uman.

fig. 11 - efectul expunerii la clona 12H3 sau clona 20E5 a anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece, sau la OX40L uman, asupra proliferării de limfocite T reglatoare umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimulatorie ale anticorpilor CD3 anti-uman/ CD28 anti-uman.

fig. 12 - efectul clonei 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece asupra proliferării mediate de OX40L uman a limfocitelor T efectoare (A) și reglatoare (B) umane, care exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice stimulatorie ale anticorpilor CD3 anti-uman/ CD28 anti-uman.

fig. 13 - efectul expunerii la clona 12H3 sau clona 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece sau la OX40L uman asupra supresiei proliferării limfocitelor T efectoare umane, care exprimă CD134 uman, mediate de limfocitele T reglatoare umane, care exprimă CD134 uman.

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

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

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

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

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

fig. 19 - legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu proteina redusă și neredusă de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman. (A) Condițiile de examinare fără reducere (a, b) și cu reducere (c, d). (B) Modelele de migrație electroforetică a proteinei de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman (rhuCD134) în condiții fără reducere (a, b) și cu reducere (c, d), utilizând colorarea cu albastru brilliant de Coomassie. (C) Western blot în cazul proteinei de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman fără (a, b) și cu reducere (c, d), expuse la anticorpii de control izotip IgG1κ de șoarece (mIgG1) sau la clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece (m12H3 și m20E5, respectiv).

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

fig. 21 - legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD2", "CRD3", "CRD4" și "CRD4 trunchiat (tc)").

fig. 22 - legarea clonelor himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ pe linia de celule 293-F, transfectată tranzitoriu cu structura CD134 uman cu o lungime completă (notată "CRD1"), sau cu diferite structuri trunchiate ale CD134 uman (notate ca "CRD2", "CRD3", "CRD4" și "CRD4 trunchiat (tc)").

fig. 23 - legarea clonei 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece (A) și a clonei himerice umane 12H3 a anticorpului anti-CD134 IgG4κ (B) cu peptida derivată din CD134 uman, care corespunde secvenței de aminoacizi din A1-modulul cu subdomeniu CRD3 – A1-modul-CRD4 trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 1994, 24, p. 677- 683).

Activarea celulelor T este mediată nu numai prin stimularea cu antigen prin receptorii celulelor T, dar și prin semnale co-stimulatorie prin moleculele co-stimulatorie. Printre unele molecule co-stimulatorie, membrul familiei de receptori ai factorului de necroză tumorală (TNF), OX40 (CD134), joacă un rol - cheie în supraviețuirea și homeostazia celulelor T efectoare și de memorie. Conform acordului convențional privind co-stimularea OX40, se produce o interacțiune între OX40 și ligandul OX40 (OX40L), când celulele T activate se leagă la celulele specializate prezentatoare de antigen (CPA). Funcțiile celulelor T, inclusiv producerea de citokine, expansiunea și supraviețuirea, sunt apoi intensificate prin semnale co-stimulatorie ale OX40. Interacțiunea dintre OX40 și OX40L are loc în timpul interacțiunii celulei T – celulă dendritică (CD), peste 2...3 zile după recunoașterea antigenului. Celula T care exprimă OX40 poate, de asemenea, interacționa cu o celulă ce exprimă OX40L, alta decât CD, și primi un semnal OX40 de la o celulă, care poate furniza semnale esențiale pentru generarea celulelor T de memorie, stimularea răspunsului Th2, și prelungirea răspunsurilor inflamatorii. Astfel, interacțiunea optimă dintre OX40 și OX40L ar putea fi formată în două etape: OX40L exprimat pe celulele T CD4 activate interacționează cu OX40 exprimat pe o altă celulă T CD4 responder, ceea ce duce la generarea optimă a celulelor T CD4 de memorie (Soroosh et al., 2006), sau OX40L exprimat pe celulele accesorii CD4+ poate promova supraviețuirea celulei Th2 prin

interacțiunea cu OX40 pe celulele Th2 (Kim et al., 2003). În plus, expresia OX40L pe celulele B este necesară pentru dezvoltarea Th2 *in vivo*, dar nu dezvoltarea Th1 (Linton et al., 2003), și mastocitele care exprimă OX40L stimulează direct funcția celulelor T efectoare prin interacțiunea dintre OX40 pe celulele T și OX40L pe mastocite (Kashiwakura et al. J. Immunol. 2004, 173, p. 5247-5257; Nakae et al. J. Immunol. 2006, 176, p. 2238-2248). Suplimentar la aceasta, deoarece celulele endoteliale exprimă, de asemenea, OX40L (Imura et al., 1996), legarea OX40 la celulele endoteliale ar putea fi implicată în inflamația vasculară. Semnalele OX40 în exces, atât la celulele T responder, cât și la celulele T reglatoare, inhibă supresia imună, mediată de Treg. Semnalele OX40 ce trec la celulele T responder le fac rezistente la suprimarea mediată de Treg. Pe de altă parte, semnalele OX40 ce trec în celulele Treg inhibă direct funcția supresoare a Treg, deși este discutabil faptul dacă semnalele OX40 ar putea controla nivelul de expresie a Foxp3 în celulele Treg. În plus, stimularea lentă a OX40 inhibă diferențierea dependentă de TGF-beta a celulelor iTreg (celule Treg inductibile). Inhibiția poate fi mediată în parte de către citokinele efectoare, cum ar fi IL - 4 și IFN - gamma, produse de celulele T efectoare, stimulate cu OX40. Este important faptul că blocarea OX40L promovează semnificativ diferențierea iTreg și induce toleranța la greșă, care ar putea fi mediată prin celulele Treg. Prin urmare, OX40 ar putea prezenta o posibilă țintă moleculară pentru controlul autoimunității mediate de celulele T. În plus, studiile recente au raportat faptul că interacțiunea dintre OX40L exprimat de celulele mastocitare și OX40 exprimat de celulele Treg poate suprima reciproc funcția mastocitelor și funcția de supresie a celulelor Treg (Gri et al., 2008; Piconese et al., 2009).

Șoarecii sunt un instrument experimental de elecție pentru imunologi, și studiul asupra răspunsurilor lor imune a oferit o înțelegere considerabilă cu privire la modul de funcționare a sistemului imunitar uman. Structura generală a șoarecelui și a sistemului uman par a fi destul de asemănătoare; cu toate acestea, există, de asemenea, diferențe semnificative. De exemplu, la șoareci, CD134 este exprimat pe Teff la activare, în timp ce Treg exprimă CD134 în mod permanent (Piconese et al. J. Exp. Med. 2008, 205, p. 825-839). La oameni, CD134 este exprimat atât pe Teff, cât și pe Treg, dar numai la activare (a vedea, de exemplu, Exemplul 2 (g), "Expresia CD134 pe limfocitele T efectoare și reglatoare umane după stimularea cu particule sferice stimulatoare a anticorpului CD3 anti-uman/anticorpului CD28 anti-uman"). Mai mult decât atât, Treg de șoarece induc apoptoza Teff de șoarece pentru obținerea supresiei (Pandiyani et al. Nat. Immunol., 2007, 8, p. 1353; Scheffold et al. Nat. Immunol., 2007, 8, p. 1285-1287), în timp ce Treg umane nu induc apoptoza în Teff umane pentru obținerea supresiei (Vercoulen et al. Plos. ONE 2009, 4, e7183). Împreună, aceste date indică diferite roluri ale CD134 în funcția de supresie a Treg în sistemul imunitar uman și cel murin.

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

Termenul "anticorp izolat" sau "moleculă de adeziune izolată" se referă la un anticorp sau la o moleculă de adeziune care: (1) nu este asociată cu componente asociate în mod natural, care o însoțesc în starea sa nativă; (2) nu conține alte proteine din aceeași specie; (3) este exprimată de o celulă dintr-o specie diferită; sau (4) nu apare în natură. Exemplele de anticorpi izolați includ un anticorp anti-CD134, care a fost purificat de afinitate prin utilizarea CD134, un anticorp anti-CD134, care a fost generat de hibridoame sau alte linii celulare *in vitro*, și un anticorp anti-CD134 uman, derivat de la un animal transgenic.

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

Termenul "anticorp" se referă la o moleculă de imunoglobulină, care este, de obicei, compusă din două perechi identice de catene polipeptidice, fiecare pereche având o catenă «greă» (H) și o catenă «ușoară» (L). Catenele ușoare umane sunt clasificate în kappa (κ) și lambda (λ). Catenele grele sunt clasificate: mu, delta, gamma, alfa sau epsilon, și definesc izotipul anticorpului ca IgM, IgD, IgG, IgA și IgE, respectiv. Fiecare catenă grea cuprinde o regiune variabilă a catenei grele (abreviată aici ca HCVR sau VH) și o regiune constantă a catenei grele. Regiunile constante ale catenei grele din IgD, IgG și IgA sunt constituite din trei domenii - CH1, CH2 și CH3, iar regiunile constante ale catenei

grele din IgM și IgE sunt constituite din patru domenii - CH1, CH2, CH3 și CH4. Fiecare catenă ușoară este constituită dintr-o regiune variabilă a catenei ușoare (abreviată aici ca LCVR sau VL) și o regiune constantă a catenei ușoare. Regiunea constantă a catenei ușoare cuprinde un domeniu - CL. Regiunile constante ale anticorpilor pot media legarea imunoglobulinei la țesuturile sau factorii gazdă, incluzând diferite celule ale sistemului imun (de exemplu, celulele efectoare). Regiunile VH și VL pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, definite ca regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni suport (FR). Fiecare regiune VH și VL este compusă din trei CDR și patru FR, aranjate de la capătul amino-terminal până la capătul carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Regiunile variabile ale fiecărei perechi de catene grele/ușoare (VH și VL), respectiv, formează situsul de legare a anticorpului. Distribuirea de aminoacizi pentru fiecare regiune sau domeniu este în conformitate cu definițiile din Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 și 1991) sau în conformitate cu definițiile Chothia et al. (Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 1989, 342, 6252, p.877-883). Termenul "anticorp" cuprinde un anticorp care este o formă multimerică de anticorpi, cum ar fi dimerii, trimerii sau multimerii de ordin superior ai anticorpilor monomerici. Acesta cuprinde, de asemenea, un anticorp care este legat sau atașat la un fragment care nu este anticorp. În plus, termenul "anticorp" nu este limitat de nici o metodă specială de producere a anticorpului. De exemplu, acesta include anticorpi monoclonali, anticorpi recombinanți și anticorpi policlonali.

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

Termenul "fragment de legare a antigenului" al unui anticorp se referă la una sau mai multe porțiuni ale unui anticorp cu o lungime completă, care păstrează capacitatea de a se lega la același antigen (de exemplu, CD134 uman), la care se leagă anticorpul. Termenul "fragment de legare a antigenului" cuprinde, de asemenea, o porțiune dintr-un anticorp, care face parte dintr-o moleculă mai mare, formată prin asociere necovalentă sau covalentă, sau dintr-o porțiune de anticorp cu una sau mai multe structuri moleculare. Exemplele de structuri moleculare suplimentare includ aminoacizi, peptide sau proteine, cum ar fi regiunea nucleului streptavidinei, care poate fi utilizată pentru a produce o moleculă tetramerică scFv (Kipriyanov et al. *Hum. Antibodies Hybridomas*, 1995, 6 (3), p. 93-101).

Termenul "anticorp himeric" se referă la un anticorp care cuprinde secvențe de aminoacizi, derivate de la doi sau mai mulți anticorpi diferiți. Cei doi sau mai mulți anticorpi diferiți pot fi de aceeași specie, sau din două, sau din mai multe specii diferite.

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

Termenul "celulă gazdă" se referă la o celulă, în care a fost introdus un vector de expresie. Termenul cuprinde nu doar celula subiectului respectiv, ci și descendentul unei astfel de celule. Deoarece pot apărea anumite modificări în generațiile succesive, determinate fie de influențele

mediului sau de mutații, un astfel de descendent poate să nu fie identic cu celula-mamă, dar este încă inclus în limitele termenului "celulă gazdă".

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

Termenul "anticorp umanizat" se referă la un anticorp himeric, care conține resturi de aminoacizi, derivate de la secvențe de anticorp uman. Un anticorp umanizat poate cuprinde o parte sau toate regiunile CDR de la un anticorp animal non-uman, în timp ce regiunile suport și regiunile constante ale anticorpului conțin resturi de aminoacizi, derivate de la secvențe de anticorp uman.

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

Termenul "acid nucleic izolat" se referă la o moleculă de acid nucleic de origine genomică, ADNc sau sintetică, sau o combinație a acestora, care este separată de alte molecule de acid nucleic, prezente în sursa naturală de acid nucleic. De preferință, un acid nucleic "izolat" este lipsit de secvențele localizate la capetele 5' și 3' ale acidului nucleic de interes în ADN genomic al organismului, de la care derivă acidul nucleic.

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

Termenii "receptorul OX40" și "receptorul CD134" sunt folosiți alternativ în prezenta invenție și includ CD134 uman, precum și variantele, izoformele, și speciile omoloage acestuia. Corespunzător, moleculele umane de adeziune, descrise aici, pot să se lege, de asemenea, în anumite cazuri, la CD134 de la alte specii decât cea umană. În alte cazuri, moleculele de adeziune pot fi complet specifice pentru CD134 uman și pot să nu prezinte specii sau alte tipuri de reactivitate încrucișată. În special, ele nu se vor lega la CD134 de șoarece sau de șobolan.

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

Determinarea legării specifice a unui anumit agent la receptorul OX40 poate fi alternativ realizată cu ușurință prin utilizarea sau adaptarea metodelor de rutină. Un test corespunzător *in vitro* se utilizează în metoda Western blot (descrisă în numeroase publicații de specialitate, de exemplu, ("Antibodies, A Laboratory manual" by Harlow and Lane). Pentru a determina dacă un agent de legare pentru receptorul OX40 se leagă specific la proteina umană OX40, este extrasă proteina celulară totală din celulele de mamifere, care nu exprimă antigenul OX40, cum ar fi celula nelimfocitară (de exemplu, o celulă COS sau o celulă CHO), transformată cu o moleculă de acid nucleic, care codifică OX40. În calitate de control negativ, proteina celulară totală este, de asemenea, extrasă din celulele corespunzătoare netransformate. Aceste preparate de proteine sunt apoi supuse electroforezei pe un gel de poliacrilamidă fără denaturare sau cu denaturare (PAGE). Ulterior, proteinele sunt transferate pe o membrană (de exemplu, nitroceluloză) prin Western blot și agentul de testat este incubat cu membrana. După spălarea membranei pentru a elimina agentul legat nespecific, prezența agentului legat este detectată prin utilizarea unui anticorp produs împotriva agentului testat, conjugat cu un agent de detectare, cum ar fi enzima fosfataza alcalină; aplicarea substratului de 5-brom-4-clor-3-indolilfosfat/nitrotetrazoliu albastru are drept rezultat producerea unui compus dens albastru de către fosfataza alcalină imuno – localizată. Agenții care se leagă specific la OX40 uman vor fi demonstrați, prin această tehnică, să se lege la banda OX40 umană (care va fi localizată într-o anumită poziție pe gel, determinată de masa sa moleculară) în extractul de celule transformate OX40, în timp ce, în extractul de celule netransformate, va fi observată o legare nesemnificativă sau va lipsi orice legare. Legarea nespecifică a agentului la alte proteine poate să apară și poate fi detectată ca un semnal slab pe Western blot. Natura nespecifică a acestei legări va fi recunoscută de către un specialist în domeniu prin semnalul slab remarcat în Western blot, comparativ cu semnalul primar puternic, care rezultă din

legarea agentului specific/proteina umană OX40. În mod ideal, un agent de legare a receptorului OX40 nu se va lega la proteinele extrase din celulele netransformate. Suplimentar la testele de legare cu utilizarea proteinelor extrase, agenții presupuși de legare a receptorului OX40 pot fi testați pentru a confirma capacitatea lor de a lega în mod substanțial numai receptorul OX40 *in vivo* prin conjugarea agentului la un marcaj fluorescent (cum ar fi FITC) și analiza legării sale de populațiile de celule T CD4+ antigen activate și neactivate prin Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). Un agent care leagă în mod substanțial numai receptorul OX40 va colora doar celulele T CD4+ activate.

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

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

Prezenta invenție se referă la molecule de adeziune izolate, care se leagă la CD134 uman, inclusiv anticorpii anti-CD134, fragmente de legare la antigen ale anticorpilor anti-CD134, și derivați ai anticorpilor anti-CD134. Moleculele de adeziune sunt caracterizate prin cel puțin una dintre următoarele proprietăți funcționale: (a) se leagă la CD134 uman cu o K_d de 1×10^{-6} M sau mai puțin și (b) nu împiedică legarea receptorului CD134 uman (OX40) de ligandul OX40 (OX40L); (c) posedă activitate agonistă asupra CD134 uman pe celulele T efectoare și/sau activitate antagonistă pe CD134 uman pe celulele T-reglatoare; (d) nu se leagă de receptorul CD40 la concentrații de până la 500 nM; (e) nu se leagă de receptorul CD137 la concentrații de până la 500 nM; (f) nu se leagă de receptorul CD271 la concentrații de până la 500 nM; (g) sunt capabile de creștere a producției de IL-2 de către celulele T umane izolate; (h) sunt capabile de stimularea răspunsului imun; (i) sunt capabile să inhibe creșterea celulelor tumorale; și (j) au un efect terapeutic în cazul cancerului. În unele variante, molecula de adeziune se leagă la CD134 uman cu o K_d de 1×10^{-7} M sau mai puțin, sau 1×10^{-8} M ori mai puțin, sau 5×10^{-9} M, ori mai puțin.

Anticorpii și alte molecule de adeziune ale invenției pot fi produse prin metode uzuale și apoi analizate pentru a identifica și pentru a obține molecule de adeziune, care nu împiedică legarea OX40L la CD134. De exemplu, pot fi selectate molecule de adeziune, care se leagă la CD134 chiar și atunci când CD134 a fost expus la o concentrație de saturație de OX40L.

Intr-o variantă de realizare a prezentei invenții este prezentat un anticorp uman care se leagă la CD134 uman. În unele variante, anticorpul uman este un anticorp monoclonal, care se leagă specific la CD134 uman cu o K_d de 100 nM sau mai puțin, preferabil de 10 nM sau mai puțin, și/sau are activitate agonistă pe CD134 uman al celulelor T-efectoare și/sau activitate antagonistă pe CD134 uman al celulelor T-reglatoare. Un exemplu de astfel de anticorp uman este clona 12H3 a anticorpului monoclonal uman. Secvența de aminoacizi a întregii regiuni variabile a catenei grele și secvențele de aminoacizi ale celor trei CDR ale regiunii variabile a catenei grele (VH) din clona 12H3 a anticorpului sunt prezentate în SEQ ID NO 12 și 14-16, respectiv. Secvența de aminoacizi a întregii regiuni variabile a catenei ușoare și secvențele de aminoacizi ale celor trei CDR ale regiunii variabile a catenei ușoare (VL) din clona 12H3 a anticorpului sunt prezentate în SEQ ID NO 13 și 17...19, respectiv.

Anticorpii din prezenta invenție cuprind una sau mai multe dintre aceste regiuni CDR, sau una ori mai multe dintre aceste CDR cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi pe o regiune CDR. Substituțiile sunt de preferință cele "conservative". Substituțiile conservative, care produc aminoacizi similari din punct de vedere funcțional, sunt bine cunoscute în domeniu (WO 2010/019702).

Dat fiind faptul că clona 12H3 se leagă de CD134 uman, secvențele VH și VL ale fiecăreia dintre ele pot fi "combinat și asamblate" cu alți anticorpi anti-CD134 pentru a crea anticorpi suplimentari. Legarea unor astfel de anticorpi "combinați și asamblați" la CD134 uman poate fi testată, utilizând testele de legare, cunoscute în domeniu, incluzând un test descris în Exemple. Într-un caz, când regiunile VH și VL sunt combinate și asamblate, o secvență VH de la o anumită asociere VH/VL este înlocuită cu o secvență VH structural similară. De asemenea, într-un alt caz, o secvență VL dintr-o anumită asociere VH/VL este înlocuită cu o secvență VL structural similară.

Moleculele care conțin doar una sau două regiuni CDR (în unele cazuri, chiar și numai o singură regiune CDR sau o parte a acesteia, în special CDR3) sunt capabile să rețină activitatea de legare la antigen a anticorpului din care sunt derivate CDR. (Laune et al. JBC, 1997, 272, p. 30937-30944; Monnet et al. JBC, 1999, 274, p. 3789-3796; Qiu et al. Nature Biotechnology, 2007, 25, p. 921-929;

Ladner et al. Nature Biotechnology, 2007, 25, p.875-877; Heap et al. J. Gen. Virol., 2005, 86, p. 1791-1800; Nicaise et al. Protein Science, 2004, 13, p.1882-91; Vaughan and Sollazzo Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2001, 4, p. 417-430; Quijcho Nature 1993, 362, p. 293-294; Pessi et al. Nature, 1993, 362, p. 367-369; Bianchi et al. J. Mol. Biol. 1994, 236, p. 649-659; Gao et al. J. Biol. Chem. 1994, 269, p. 32389-32393).

Respectiv, o variantă de realizare a prezentei invenții este un anticorp CD134 anti-uman izolat, care cuprinde: (a) o regiune variabilă a catenei grele, cuprinzând secvența de aminoacizi a SEQ ID NO 12; (b) o regiune variabilă a catenei ușoare, care cuprinde secvența de aminoacizi a SEQ ID NO 13.

Intr-o altă variantă, conform invenției, este prevăzută o moleculă izolată de adeziune CD134, care cuprinde: (a) o catenă grea CDR1, care conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO 14; și/sau (b) o catenă grea CDR2, care conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO 15; și/sau (c) CDR3 al catenei grele, care conține secvența de aminoacizi SEQ ID NO 16.

Intr-un alt exemplu de realizare, conform invenției, este prevăzută o moleculă izolată de adeziune CD134, care cuprinde: (a) o catenă ușoară CDR1, ce cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO 17; și/sau (b) o catenă ușoară CDR2, ce cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO 18; și/sau (c) o catenă ușoară CDR3, ce cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO 19.

Clasa (de exemplu, IgG, IgM, IgE, IgA sau IgD) și subclasa (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4) anticorpilor anti-CD134 poate fi determinată prin orice metodă indicată, cum ar fi prin ELISA sau Western Blot, precum și prin alte tehnici. În mod alternativ, clasa și subclasa pot fi determinate prin secvențierea tuturor sau a unei părți dintre domeniile constante ale catenelor grele și/sau ușoare ale anticorpilor, comparand secvențele lor de aminoacizi cu secvențele cunoscute de aminoacizi din diferite clase și diferite subclase de imunoglobuline, și determinând clasa și subclasa anticorpilor. Anticorpul anti-CD134 pot fi molecule de IgG, IgM, IgE, IgA sau IgD. De exemplu, anticorpul anti-CD134 poate fi o IgG, care este din subclasa IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4. Astfel, un alt aspect al invenției propune o metodă pentru transformarea clasei sau subclasei unui anticorp anti-CD134 într-o altă clasă sau subclasă.

Moleculele de adeziune, în conformitate cu o variantă de realizare a invenției, includ anticorpi monoclonali, fragmente ale acestora, peptide și alte structuri chimice. Anticorpul monoclonal pot fi creați prin metoda convențională de imunizare a unui mamifer, urmată de izolarea celulelor B plasmactice, care produc anticorpii monoclonali de interes și fuziunea cu o celulă de mielom.

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

Se va aprecia că mimeticele anticorpilor (de exemplu, structuri de schelet neanticorp, care au un grad înalt de stabilitate și, totuși, permit introducerea variabilității în anumite poziții) pot fi utilizate pentru a crea biblioteci moleculare, din care pot fi derivate aceste resturi de legare. Specialiștii în domeniul biochimiei vor cunoaște mai multe de astfel de molecule. Aceste molecule pot fi utilizate ca fragment de legare la agentul din prezenta invenție.

Sunt discutate numeroase exemple de mimetice ale anticorpilor și includ: afficorpi (de asemenea numiți Trinetine; (Nygren, FEBS J., 2008, 275, p. 2668-2676); CTLD (de asemenea numiți Tetranectine; (Innovations Pharmac. Technol. 2006, p. 27-30); adnectine (de asemenea numite monocorpi; (Meth. Mol. Biol., 352, 2007, p. 95-109); anticaline (Drug Discovery Today, 10, 2005, p. 23-33); DARPine (ankirine; (Nat. Biotechnol. 22, 2004, p.575-582); avimeri (Nat. Biotechnol. 23, 2005, p. 1556-1561); microcorpi (FEBS J., 274, 2007, p. 86-95); aptameri peptidici (Expert. Opin. Biol. Ther. 5, 2005, p.783-797); domenii Kunitz (J. Pharmacol. Exp. Ther., 318, 2006, p. 803-809); affiline (Trends. Biotechnol. 23, 2005, p. 514-522).

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

Prin "moleculă mică" se definește un compus organic cu o greutate moleculară mică de 900 de Daltoni sau mai puțin. Deși biopolimerii mari, cum ar fi acizii nucleici, proteinele și polizaharidele (cum ar fi amidonul sau celuloza) nu sunt incluse ca "molecule mici", sunt incluși monomerii constitutivi ai acestora (ribo- sau dezoxiribonucleotidele, aminoacizii și monozaharidele, respectiv) și oligomerii (adică polimerii scurți, cum ar fi dinucleotidele, peptidele, cum ar fi glutatoniul antioxidant, și dizaharidele, cum ar fi zaharoza). Producerea de molecule mici este descrisă în literatura de specialitate (Mayes & Whitcombe, Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 2005, p.1742-1778; Root-Bernstein & Dillon, Curr. Pharm. Des., 14, 2008, p. 55-62).

CovX-Corpii sunt creați prin legare covalentă a unui farmacofor printr-o legătură cu situsul de legare al unui anticorp special proiectat, reprogramand eficient anticorpul (Tryder et al. Bioorg. Med.

Chem. Lett., 17, 2007, p. 501-506). Rezultatul este o nouă clasă de structuri chimice, care se formează, în care fiecare component contribuie cu trăsături dorite la *CovX-Corpu*l intact - în special, structura posedă acțiunile biologice ale peptidei și timpul prelungit de înjumătățire al anticorpului.

Anticorpul uman pot fi obținuți prin mai multe metode diferite, inclusiv prin utilizarea bibliotecilor de expresie a imunoglobulinelor umane (Stratagene Corp, La Jolla, California; Cambridge Antibody Technology Ltd., London, England) pentru a produce fragmente de anticorpi umani (VH, VL, Fv, Fd, Fab, sau (Fab')₂), și de a utiliza aceste fragmente pentru a construi anticorpi umani întregi prin fuziunea porțiunii respective în acest sens, folosind tehnici similare cu cele pentru producerea de anticorpi himerici. Anticorpul uman pot fi de asemenea produși la șoarecii transgenici cu un genom de imunoglobulină umană. Astfel de șoareci sunt disponibili, de exemplu, de la Abgenix, Inc., Fremont, California, și Medarex, Inc., Annandale, New Jersey. Pe lângă conectarea regiunilor Fv ale catenei grele și ale celei ușoare pentru a forma un singur lanț peptidic, Fab pot fi construite și exprimate prin tehnici similare (M. J. Evans et al. J. Immunol. Meth., 184, 1995, p. 123-138).

Anticorpul DelimmunizedTM reprezintă anticorpi, la care au fost eliminați epitopii celulelor T potențial imunogene (PCT/GB98/01473). Prin urmare, se așteaptă că imunogenitatea la oameni va fi eliminată sau redusă substanțial, atunci când aceștia vor fi aplicați *in vivo*. Moleculele de adeziune, conform invenției, pe bază de imunoglobuline, pot avea epitopii lor imunogeni T celulari (dacă sunt prezenți), eliminați prin astfel de metode.

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

Anticorpul bispecific pot fi utilizați în calitate de agenți de legare încrucișată între CD134 umani din aceeași celulă țintă umană, sau CD134 umani de pe două celule țintă umane diferite. Astfel de anticorpi bispecifici au o specificitate pentru fiecare din cei doi epitopi diferiți de pe CD134 uman. Acești anticorpi și metoda de producere a lor sunt descrise în literatura brevetară (US 5534.254) (Creative Biomolecules, Inc). Diferite variante de anticorpi bispecifici, descrise în brevet, includ legarea lanțului unic Fv cu cuplatorii de peptide, incluzând Ser-Cys, (Gly)₄-Cys, (His)₆-(Gly)₄-Cys, agenți de chelatare, și cuplaje chimice sau disulfidice, inclusiv bismaleimidohexan și bismaleimidocaproil.

Moleculele non-anticorpi pot fi izolate sau sortate de bibliotecile chimice prin metode uzuale. Un sistem automat pentru formarea și analiza unei biblioteci chimice este deja descris (US 5901069, US 5463564). O abordare mai concentrată implică modelarea tridimensională a situsului de legare, și, ulterior, producerea unei familii de molecule care se potrivesc modelului. Acestea sunt apoi sortate pentru identificarea celor cu caracteristici optime de legare.

O altă abordare ar consta în formarea bibliotecilor de peptide recombinante și, ulterior, analiza acestora pentru a identifica peptidele care se leagă la epitopul CD134 uman, ce prezintă interes (US 5723322). Acest epitop este același cu cel legat de anticorpul monoclonal, descriși în exemplele în continuare. Moleculele pot, de fapt, să fie generate sau izolate cu o facilitare relativă în conformitate cu metodele bine cunoscute din domeniu, odată ce epitopul este cunoscut.

O altă variantă de realizare prevede derivații oricăruia dintre anticorpul anti-CD134, așa cum este descris mai sus. Într-un aspect particular, derivatul anticorpului își are originea din modificările secvențelor de aminoacizi ale clonei 12H3. Secvențele de aminoacizi din oricare regiuni ale lanțurilor de anticorpi pot fi modificate, cum ar fi regiunile suport, regiunile CDR sau regiunile constante. Modificările pot fi introduse prin metode standard cunoscute în domeniu, cum ar fi mutageneza direcționată pe situs și mutageneza aleatorie, mediată de PCR, și pot cuprinde aminoacizi naturali, precum și nenaturali. Tipurile de modificări includ inserțiile, delețiile, substituțiile sau combinații ale acestora, ale unuia sau mai multor aminoacizi dintr-un anticorp anti-CD134. În unele variante, derivatul anticorpului cuprinde 1, 2, 3 sau 4 substituții de aminoacizi în regiunile CDR ale catenelor grele și/sau o substituție de aminoacid în regiunile CDR ale catenei ușoare. În unele variante aplicate, un derivat al unui anticorp anti-CD134 cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi în raport cu secvența de aminoacizi a liniei germinale din gena umană. Într-o variantă particulară, una sau mai multe dintre aceste substituții ale liniei germinale se află în regiunea CDR2 a catenei grele. Într-un alt model particular de realizare, substituțiile de aminoacizi în raport cu linia germinală se află în una sau mai multe dintre aceleași poziții, ca și substituțiile în raport cu linia germinală din clona 12H3. Într-o altă variantă de realizare, substituția de aminoacizi va modifica una sau mai multe cisteine dintr-un anticorp la un alt rest, cum ar fi, fără limitare, alanina sau serina. Cisteina poate fi o cisteină canonică

sau una necanonică. Substituția poate fi făcută într-o regiune CDR sau într-o regiune suport a unui domeniu variabil, sau în domeniul constant al unui anticorp. Un alt tip de substituție aminoacidică va elimina perechile asparagină-glicină, care formează situsuri potențiale de dezaminare, prin modificarea unuia sau a ambelor resturi. În alte variante, substituția aminoacidului este o substituție conservativă de aminoacid. Într-o variantă de realizare, derivatul anticorpului are 1, 2, 3 sau 4 substituții conservative de aminoacizi în regiunile CDR ale catenei grele în raport cu secvențele de aminoacizi ale clonei 12H3. Un alt tip de modificare a unui anticorp anti-CD134 este modificarea modelului inițial de glicozilare a anticorpului. Termenul de "modificare" se referă la eliminarea uneia sau mai multor părți de carbohidrat, găsite în anticorp, și/sau adăugarea unuia sau mai multor situsuri de glicozilare, care nu sunt prezente în anticorp.

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

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

O altă variantă de realizare propune un derivat de anticorp, care este un anticorp himeric, cuprinzând o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-CD134 uman, descris aici mai sus. Într-un alt exemplu, toate regiunile CDR ale anticorpului himeric sunt derivate de la anticorpi anti-CD134 uman. Într-un alt exemplu, CDR de la mai mult de un anticorp CD134 anti-uman sunt combinate într-un anticorp himeric. Mai mult, un anticorp himeric poate cuprinde regiunile suport, derivate de la un anticorp anti-CD134 uman, și una sau mai multe regiuni CDR de la unul sau mai mulți anticorpi umani diferiți. Anticorpul himeric pot fi generați, folosind metode convenționale, cunoscute în domeniu. În unele variante particulare, anticorpul himeric cuprinde una, două sau trei regiuni CDR din regiunea variabilă a catenei grele sau din regiunea variabilă a catenei ușoare a unui anticorp selectat din clona 12H3 a anticorpului.

Exemplele de alți derivați de anticorpi, propuse de prezenta invenție, includ anticorpul cu un singur lanț, diacorpul, anticorpul de domeniu, nanocorpul și unicorpul. În variantele de preferat, anticorpul monoclonal pot fi anticorpi himerici, anticorpi umanizați, anticorpi umani, anticorpi DelmunitizedTM, anticorpi cu un singur lanț, fragmente, inclusiv Fab, F(ab')₂, Fv sau alte fragmente care păstrează funcția de legare la antigen a anticorpului sursă. Anticorpul cu un singur lanț ("ScFv") și metoda de construcție este cunoscută (US 4.946.778).

Un "anticorp cu un singur lanț" (scFv) constă dintr-un singur lanț polipeptidic, care cuprinde un domeniu VL legat de un domeniu VH, unde domeniul VL și VH sunt împerecheate pentru a forma o

- moleculă monovalentă. Anticorpul cu un singur lanț pot fi produși în conformitate cu metoda cunoscută în domeniu (Bird et al. Science, 242, 1988, p. 423-426; Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 85, 1988, p. 5879-5883). Un "diacorp" constă din două lanțuri, fiecare lanț cuprinzând o regiune variabilă a catenei grele, conectată la o regiune variabilă a catenei ușoare pe același lanț polipeptidic, cuplat printr-o peptidă scurtă de legătură, în care cele două regiuni de pe același lanț nu se cuplează una cu alta, dar cu domenii complementare de pe celălalt lanț, pentru a forma o moleculă bispecifică. Metodele de preparare a diacorpilor sunt cunoscute în domeniu (Holliger P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. SUA 90, 1993, p. 6444-6448; Poljak R. J. et al. Structure 2, 1994, p.1121-1123). Anticorpul de domeniu (dAc) sunt unități funcționale mici de legare a anticorpilor, care corespund regiunilor variabile ale catenelor grele sau ușoare ale anticorpilor. Anticorpul de domeniu sunt bine exprimați în sistemele de celule ale bacteriilor, drojdiilor și mamiferelor. Detaliile suplimentare despre anticorpul de domeniu și metodele de producere ale acestora sunt cunoscute în domeniu (US 6.291.158; US 6.582.915; US 6.593.081; WO04/003019; WO03/002609). Nanocorpul își au originea din catenele grele ale unui anticorp. Un nanocorp cuprinde în mod tipic un singur domeniu variabil și două domenii constante (CH2 și CH3), și păstrează capacitatea de legare a antigenului de la anticorpul original. Nanocorpul pot fi produși prin metode cunoscute în domeniu (US 6.765.087; US 6.838.254; WO 06/079372). Unicorpul sunt alcătuiți dintr-o catenă ușoară și o catenă grea al unui anticorp IgG4. Unicorpul pot fi creați prin înlăturarea regiunii balama a anticorpilor IgG4. Detalii suplimentare despre unicorpi și metodele de preparare sunt prezentate în literatura brevetară (WO2007/059782).
- Suplimentar la fragmentul de legare, moleculele din invenție mai pot conține un rest pentru creșterea timpului de înjumătățire *in vivo* al moleculei, cum ar fi, dar nu numai, cel de polietilenglicol (PEG), albumină serică umană, grupurile de glicozilare, acizii grași și dextranul. Astfel de fragmente suplimentare pot fi conjugate sau combinate în alt mod cu fragmentul de legare, folosind metode bine cunoscute în domeniu.
- Un alt aspect al invenției propune o moleculă de acid nucleic, care codifică o secvență de aminoacizi a unei molecule de adeziune, ce leagă CD134, conform primului aspect al invenției. Secvența de aminoacizi, codificată de către molecula de acid nucleic, poate fi orice porțiune a unui anticorp intact, cum ar fi o regiune CDR, o secvență care cuprinde una, două sau trei regiuni CDR, sau o regiune variabilă a unui lanț greu sau ușor, sau aceasta poate fi o catenă grea sau ușoară cu o lungime completă. În unele variante, molecula de acid nucleic codifică o secvență de aminoacizi, care cuprinde: (1) o regiune CDR3, în special o regiune CDR3 a unui lanț greu al clonei 12H3 a anticorpului; (2) o regiune variabilă a unui lanț greu sau o regiune variabilă a unui lanț ușor de clonă 12H3 a anticorpului; sau (3) o catenă grea sau o catenă ușoară de clonă 12H3 a anticorpului. În alte variante, molecula de acid nucleic codifică o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi, selectată din grupul constând din SEQ ID NO 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 sau 19.
- Moleculele de acid nucleic, propuse în prezentare, pot fi obținute din orice sursă, care produce un anticorp CD134, în conformitate cu invenția. ARNm de la celulele producătoare de anticorpi anti-CD134 poate fi izolat prin tehnici standard, clonat și/sau amplificat prin PCR și tehnici de construcție ale bibliotecilor chimice, și sortat folosind protocoale standard pentru a obține molecule de acid nucleic, care codifică o secvență de aminoacizi a unui anticorp anti-CD134. ARNm poate fi utilizat pentru a produce ADNc pentru utilizarea acestuia în reacția de polimerizare în lanț (PCR) sau clonarea ADNc a genelor de anticorpi. Într-o variantă, molecula de acid nucleic este obținută dintr-un hibridom care exprimă un anticorp anti-CD134, așa cum este descris mai sus, de preferință, un hibridom care are ca unul dintre partenerii săi de fuziune o celulă non-umană de animal transgenic, care exprimă gene de imunoglobulină umană. Într-o altă variantă, hibridomul este derivat de la un animal non-transgenic, non-uman.
- O moleculă de acid nucleic, care codifică lanțul greu al unui anticorp anti-CD134, poate fi construită prin fuzionarea unei molecule de acid nucleic, care codifică regiunea variabilă a catenei grele, cu o moleculă de acid nucleic, care codifică o regiune constantă a unui lanț greu. În mod similar, o moleculă de acid nucleic, care codifică lanțul ușor al unui anticorp anti-CD134 poate fi construită prin fuzionarea unei molecule de acid nucleic, care codifică regiunea variabilă a catenei ușoare, cu o moleculă de acid nucleic, care codifică o regiune constantă a unui lanț ușor. Moleculele de acid nucleic, care codifică lanțul VH și VL, pot fi transformate în gene de anticorpi cu lungime completă prin inserarea acestora în vectori de expresie, care deja codifică regiunile constante ale catenei grele și regiunile constante ale catenei ușoare, respectiv, astfel încât segmentul VH este legat operațional la segmentul (-ele) regiunii constante a catenei grele (CH) din vector și segmentul VL este legat operațional la segmentul regiunii constante a catenei ușoare (CL) din vector. În mod alternativ, moleculele de acid nucleic, care codifică lanțurile VH sau VL, sunt transformate în gene de anticorpi cu lungime completă prin unirea, de exemplu, ligarea, moleculei de acid nucleic, care codifică un lanț

VH la o moleculă de acid nucleic, care codifică un lanț CH, folosind tehnici standard de biologie moleculară. Același lucru se poate realiza folosind molecule de acid nucleic, care codifică lanțuri VL și CL. Moleculele de acid nucleic, care codifică lanțurile grele și/sau ușoare cu lungime completă, pot fi apoi exprimate dintr-o celulă în care au fost introduse, iar anticorpii anti-CD134 izolați.

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

15 Odată ce sunt obținute moleculele de ADN, care codifică segmentele VH și VL ale unui anticorp anti-CD134, aceste molecule de ADN pot fi manipulate în continuare prin tehnici de ADN recombinant, de exemplu, pentru a transforma genele regiunii variabile în genele lanțului anticorpului cu lungime completă, în gene ale fragmentului Fab, sau într-o genă scFv.

20 Un alt aspect al invenției propune un vector, care cuprinde o moleculă de acid nucleic, descrisă aici mai sus. Molecula de acid nucleic poate codifica o porțiune dintr-o catenă ușoară sau dintr-o catenă grea (cum ar fi o regiune CDR sau o regiune variabilă), o catenă grea sau unul ușor cu lungime completă, o polipeptidă care cuprinde o porțiune sau lungimea completă a unui lanț greu sau ușor, sau o secvență de aminoacizi a unui derivat de anticorp sau fragment de legare a antigenului.

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

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

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

55 Exemple de celule gazdă de drojdie includ *Saccharomyces cerevisiae* și *Pichia pastoris*. Secvențele de aminoacizi ale unei molecule de adeziune, exprimate de diferite linii celulare sau la animale transgenice, pot avea diferite tipuri de glicosilare. Cu toate acestea, toate moleculele de adeziune, codificate de moleculele de acid nucleic, prezentate aici, sau care cuprind secvențele de aminoacizi prezentate aici, sunt parte a prezentei invenții, indiferent de glicosilarea moleculelor de adeziune.

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

Intr-un exemplu de realizare, preferat conform invenției, se propune o compoziție, de exemplu, o compoziție farmaceutică, care conține una sau o combinație de molecule de adeziune, așa cum este descris aici, și, optional, un purtător farmaceutic acceptabil. Compozițiile pot fi preparate prin metode convenționale, cunoscute în domeniu. În unele variante, compoziția cuprinde un anticorp anti-CD134 sau un fragment de legare a antigenului acestuia. Într-o variantă particulară, compoziția cuprinde clona 12H3 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului al oricărui anticorp. În alte exemple, compoziția conține un derivat de clonă 12H3 a anticorpului. Termenul "purtător farmaceutic acceptabil" se referă la orice substanță inactivă, care este potrivită pentru utilizarea într-o formă de livrare a unei molecule de adeziune. Un purtător poate fi un antiadeziv, liant, agent de acoperire, agent de dezintegrare, umplutură sau diluant, conservant (cum ar fi un agent antioxidant, antibacterian, sau agent antifungic), edulcorant, agent de întârziere a absorbției, agent de umectare, agent de emulsifiere, tampon, și altele similare.

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

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

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

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

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

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

Un alt aspect al invenției prezintă o metodă de modulare a răspunsurilor imune antitumorale, mediate de CD134 uman, în care respectiva metodă nu include molecule de adeziune, care se leagă la CD134 uman, inclusiv anticorpi anti-CD134 uman, cum ar fi mimeticele umane OX40L, care interacționează cu domeniul de legare a OX40L uman pe receptorul uman CD134 și/sau blochează semnalizarea celulară CD134 uman - OX40L uman.

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

Intr-un aspect particular, sunt prezentate metodele de creștere a răspunsului imun la un mamifer, cuprinzând administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente dintr-o moleculă de adeziune, așa cum este descris aici. În unele variante, molecula de adeziune este un anticorp anti-CD134 sau un fragment de legare a antigenului acestuia și mamiferul este omul. Într-o altă variantă, molecula de adeziune este clona 12H3 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului din oricare anticorp. Termenul "creșterea răspunsului imun" înseamnă stimularea, evocarea, mărirea, ameliorarea sau sporirea oricărui răspuns al sistemului imunitar al unui mamifer. Răspunsul imun poate fi un răspuns celular (adică mediat de celule, cum ar fi mediat de limfocitele T citotoxice) sau un răspuns umoral (adică răspuns mediat de anticorpi), și poate fi un răspuns imun primar sau secundar. Exemplele de creștere a răspunsului imun includ creșterea activității celulelor T helper CD4+ și generarea de celule T citolitice. Creșterea răspunsului imun poate fi evaluată, folosind o serie de teste *in vitro* sau *in vivo*, cunoscute specialiștilor în domeniu, incluzând, dar nu numai, testele limfocitelor T citotoxice, eliberarea de citokine (de exemplu, producția de IL-2), regresia tumorilor, supraviețuirea animalelor care poartă tumori, producerea de anticorpi, proliferarea celulelor imune, expresia markerilor celulari de suprafață și citotoxicitatea. Într-o variantă, metoda crește răspunsul imun celular, în special, un răspuns al celulelor T citotoxice.

Un aspect al invenției prezintă o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, unde, la concentrația de saturație sau depășind concentrația de saturație a respectivei molecule de adeziune, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu nu mai mult de 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman, la măsurarea printr-un test de citometrie în flux pe bază de fluorescență, așa cum este descris în Exemplul 2(f). Mai preferabil, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu nu mai mult de aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, sau, de preferat, cu nici o reducere a legării.

Un alt aspect al invenției prezintă o moleculă de adeziune, în care la o concentrație de 70 nM a moleculei de adeziune efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult 70% pe celulele T care exprimă CD134 uman, la măsurarea printr-un test de citometrie în flux pe bază de fluorescență, așa cum este descris în Exemplul 2(f). Mai preferabil, efectul asupra legării OX40L la CD134 este redus cu cel mult circa 60%, sau circa 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, sau, de preferință, în lipsa reducerii legării.

Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care concurează pentru legarea CD134 uman cu un anticorp, și care cuprinde: (1) o regiune variabilă a catenei grele, care cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO 12 și (2) o regiune variabilă a catenei ușoare, care cuprinde secvența de aminoacizi SEQ ID NO 13, așa cum este demonstrat prin competiție încrucișată dintre o moleculă respectivă nemarcată de adeziune și un anticorp respectiv marcat fluorescent pe T-limfocitele cu expresia CD134 uman, stimulate cu PHA, măsurarea fiind efectuată prin citometrie în flux (descrișă mai departe în Exemplul 2(e)). Preferabil, legarea anticorpului respectiv, la concentrația sa de saturație sau depășind concentrația sa de saturație, este redusă cu cel puțin aproximativ 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, sau aproximativ 80%, sau aproximativ 90% sau mai mult, și este, în mod preferabil, abolită, la testarea prin competiție încrucișată împotriva moleculei respective de adeziune.

Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, unde efectul asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult aproximativ 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau

aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și în care molecula respectivă de adeziune nu împiedică ulterior răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

5 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care nu împiedică ulterior răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

10 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, unde efectul asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și în care molecula respectivă de adeziune stimulează răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

15 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care stimulează răspunsurile imunostimulatoare și/sau proliferative ale OX40L uman pe celulele T efectoare, care exprimă CD134 uman.

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

25 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care nu împiedică ulterior răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

30 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și care stimulează răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

35 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care stimulează răspunsurile funcției supresoare ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

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

45 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu inhibă sau previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care nu împiedică răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

50 Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, efectul căreia asupra legării OX40L la CD134 pe celulele T care exprimă CD134 uman este redus cu cel mult circa 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10% ori mai puțin, și care inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

Un alt aspect al invenției propune o moleculă de adeziune, care se leagă la CD134 uman, care nu inhibă sau previne legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L) și care inhibă răspunsurile proliferative ale OX40L uman pe celulele T reglatoare, care exprimă CD134 uman.

55 O metodă adecvată de măsurare a legării simultane a OX40L și a anticorpului anti-CD134 este descrisă în continuare. Semnalul fluorescent FITC (media geometrică sau media intensității fluorescente (MFI)) al legării OX40L uman pe PBMC (celulele mononucleare ale sângelui periferic) PHA- stimulate, care exprimă CD134 uman, în absența anticorpului anti-CD134 uman, se stabilește la 100%. Semnalul fluorescent PE (MFI) al legării anticorpului anti-CD134 uman pe PBMC PHA-

stimulate, care exprimă CD134 uman, în absența OX40L uman, se stabilește la 100%. Reducerea acestui semnal fluorescent FITC și a semnalului fluorescent PE atunci când atât OX40L uman, cât și anticorpus CD134 anti-uman, se adaugă simultan la PBMC PHA-stimulate, care exprimă CD134 uman, de preferință nedepășind aproximativ 70%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 50%, sau

5 aproximativ 40%, sau aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.
O metodă adecvată de măsurare a lipsei impedimentului asupra răspunsurilor proliferative ale Teff, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Modificările (adică

10 reducere sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman, (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28) de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.
O metodă adecvată de măsurare a stimulării răspunsurilor proliferative ale Teff, mediate de

15 OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Stimularea acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci cand atat OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință depășește aproximativ 30%, sau

20 aproximativ 40%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, ori mai mult.
O metodă adecvată de măsurare a lipsei impedimentului asupra funcției supresoare a Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman, care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), după tratamentul cu OX40L uman, se stabilește la 100%. Modificările (adică

25 reducere sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atat OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Teff activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), care sunt co-

cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.
O metodă adecvată de măsurare a stimulării funcției supresoare a Treg, mediate de OX40L, este

30 descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Teff care exprimă CD134 uman, care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), după tratamentul cu OX40L uman, se stabilește la 100%. Stimularea acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci cand atat OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan

35 la Teff activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), care sunt co-cultivate cu Teff care exprimă CD134 uman (de exemplu, raportul Teff/Treg = 1:1), de preferință depășește aproximativ 30%, sau aproximativ 40%, sau aproximativ 50%, sau aproximativ 60%, sau aproximativ 70%, ori mai mare.

O metodă adecvată de măsurare a lipsei impedimentului asupra răspunsurilor proliferative ale Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Treg care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Modificările (adică reducere sau creșterea) acestei incorporări a timidinei tritiate sau BrdU, atunci când atât OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Treg activate, care exprimă

40 CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință nu depășesc aproximativ 30%, sau aproximativ 20%, sau aproximativ 10%, ori mai puțin.
O metodă adecvată de măsurare a inhibiției răspunsurilor proliferative ale Treg, mediate de OX40L, este descrisă în continuare. Incorporarea timidinei tritiate sau BrdU în Treg care exprimă CD134 uman după tratamentul cu OX40L uman se stabilește la 100%. Reducerea acestei incorporări a

45 timidinei tritiate sau BrdU, atunci cand atat OX40L uman, cat și anticorpus anti-CD134 uman, sunt adăugați simultan la Treg activate, care exprimă CD134 uman (de exemplu, PHA-stimulate sau stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28), de preferință depășește nivelul de aproximativ

50 30%, sau de aproximativ 40%, sau de aproximativ 50%, sau de aproximativ 60%, sau de aproximativ 70%, ori mai mult.

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

55 prezentei invenții.
Într-o variantă ulterioară preferată a invenției, molecula de adeziune este clona 12H3 a anticorpusului, sau un fragment de legare a antigenului oricărui anticorpus. Într-o altă variantă, mamiferul este omul.

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

Termenul "profilaxia cancerului" sau "prevenirea cancerului" se referă la întârzierea, inhibarea sau prevenirea instalării unui cancer la un mamifer, la care debutul oncogenezei sau tumorigenezei nu este dovedit, dar este identificată o predispoziție pentru cancer, fie determinată de screening-ul genetic, de exemplu, sau într-un alt mod. Termenul cuprinde, de asemenea, tratarea unui mamifer cu stări precanceroase pentru a stopa progresia, sau pentru a produce regresia stărilor precanceroase spre malignitate. Exemplele de stări precanceroase includ hiperplazia, displazia și metaplazia. În unele variante, molecula de adeziune este un anticorp anti-CD134 sau un fragment al acestuia, conform prezentei invenții. Într-un alt exemplu al invenției, este prezentată o moleculă de adeziune, selectată din clona 12H3 și/sau clona 20E5 a anticorpului, sau un fragment de legare a antigenului oricărui anticorp. Intr-o altă variantă, mamiferul este omul.

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

Intr-o altă variantă a invenției, moleculele de adeziune pot fi administrate separat în calitate de monoterapie sau pot fi administrate în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici sau terapii. Astfel, într-o altă variantă a invenției, se prezintă o metodă de tratare sau prevenire a cancerului printr-o terapie combinată, metodă care cuprinde administrarea unei molecule de adeziune, conform prezentei invenții, în combinație cu una sau mai multe terapii suplimentare sau agenți terapeutici. Termenul "tratament suplimentar" se referă la o terapie care nu utilizează o moleculă de adeziune, propusă în prezentare în calitate de agent terapeutic. Termenul "agent terapeutic suplimentar" se referă la orice agent terapeutic, cu excepția moleculei de adeziune, propuse în prezentare. În unele variante, molecula de adeziune este clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman, sau un fragment de legare a antigenului oricărui anticorp. Într-un aspect particular, prezenta descriere propune o terapie combinată pentru tratarea cancerului la un mamifer, care cuprinde administrarea la mamifer a unei cantități terapeutice eficiente dintr-o moleculă de adeziune, conform prezentei invenții, în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari. Într-o altă variantă, mamiferul este omul.

O mare varietate de agenți terapeutici anticanceroși pot fi utilizați în combinație cu o moleculă de adeziune. Un specialist în domeniu va recunoaște prezența și dezvoltarea altor terapii anticanceroase, care pot fi utilizate în combinație cu metodele și moleculele de adeziune din prezenta descriere, și nu se va limita la acele forme de terapie, stabilite aici. Exemplele de categorii ale agenților terapeutici suplimentari, care pot fi utilizați în terapia combinată pentru tratarea cancerului, includ: (1) agenți chimioterapeutici, (2) agenți imunoterapeutici și (3) agenți terapeutici hormonal.

Termenul "agent chimioterapeutic" se referă la o substanță chimică sau biologică, care poate provoca moartea celulelor canceroase, sau interferează cu diviziunea, reparația, creșterea și/sau funcția celulelor canceroase (WO 2006/088639; WO 2006/129163; US 20060153808).

Termenul "agenți imunoterapeutici" se referă la substanțe chimice sau biologice, care pot ameliora un răspuns imun al unui mamifer. Exemplele de agenți imunoterapeutici includ: bacilul Calmette-Guerin (BCG); citokine, cum ar fi interferonii; vaccinuri, cum ar fi imunoterapia personalizată MyVax, Onyvax-P, Oncophage, GRNVACI, Favld, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX și NeuVax; și anticorpi, cum ar fi alemtuzumab (CAMPATH), bevacizumab (AVASTIN), cetuximab (ERBITUX), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG), ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN), panitumumab (VECTIBIX), rituximab (RITUXAN, MABTHERA), trastuzumab (HERCEPTIN), tositumomab (BEXXAR), tremelimumab, CAT-3888, și anticorpi agoniști ai receptorului CD40 (WO2003/040170).

Termenul "agent terapeutic hormonal" se referă la o substanță chimică sau biologică, care inhibă sau elimină producerea unui hormon, sau inhibă ori contracarează efectul unui hormon asupra creșterii și/sau supraviețuirii celulelor canceroase. Sunt cunoscute exemple de astfel de agenți potriviți pentru metodele descrise aici (US 20070117809). Exemplele de agenți terapeutici hormonalii particulari includ: tamoxifenul (NOLVADEX), toremifenul (Fareston), fulvestrantul (FASLODEX), anastrozolul (ARIMIDEX), exemestanul (AROMASIN), letrozolul (FEMARA), acetatul de megestrol (MEGACE), goserelinul (ZOLADEX) și leuprolida (LUPRON). Moleculele de adeziune, conform prezentei invenții, pot fi, de asemenea, utilizate în combinație cu terapii hormonale nemedicamentoase, cum ar fi: (1) metode chirurgicale, care elimină toate sau o parte din organele sau glandele care participă la producerea de hormoni, cum ar fi ovarele, testiculele, glanda suprarenală și

glanda pituitară, și (2) tratamentul radioterapeutic, în care organele sau glandele pacientului sunt supuse radiației într-o cantitate suficientă pentru a inhiba sau elimina producerea de hormon vizat.

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

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

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

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

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

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

Această invenție este ilustrată în continuare prin următoarele exemple, care nu trebuie considerate în nici un caz ca impunând restricții în domeniul de aplicare a acesteia. Dimpotrivă, trebuie să fie clar înțeles că se poate recurge la diverse alte variante, modificări și echivalenți ai acestora care, după citirea descrierii de față, ar putea fi sugerate specialiștilor în domeniu fără a ne îndepărta de caracterul prezentei invenții și/sau scopul revendicărilor anexate.

Exemple

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

(a) Generarea celulelor Sf9 de insecte, care exprimă CD134 de suprafață ADNc care codifică proteinele CD134 umane (GenBank ref CAB96543.1; a se vedea SEQ ID NO 1) a fost optimizat pentru expresia celulelor Sf9 la insecte (*Spodoptera frugiperda*) și sintetizat de GENEART, Regensburg, Germania (a se vedea SEQ ID NO 2). Acest ADNc a fost subclonat în plasmida de transfer a baculovirusului pVL1393 (setul de transfecție BD cat NO 560129; BD Biosciences). Ulterior, celulele Sf9 de insecte (ATCC) au fost co-transfectate cu plasmida de transfer pVL1393, care conține ADNc, ce codifică CD134 uman împreună cu BaculoGold Baculovirus ADN (set de transfecție BD), și apoi incubate la 27°C timp de 4...5 zile. După această etapă de co-transfecție, supranatantul a fost colectat și depozitat la 4°C, și utilizat pentru a infecta mai multe celule Sf9 de insecte pentru amplificarea virusului. Cu acest scop, celulele Sf9 de insecte au fost transfectate cu baculovirus recombinant amplificat, și apoi incubate la 27°C, timp de 3...5 zile. Aceste celule Sf9 de insecte au fost recoltate, spălate cu PBS (soluție-tampon fosfat) sterilă, și alicotate în cantitate de 5 x 10⁶ celule/250 μl în PBS și păstrate la -80°C pentru a obține lizate celulare. Înainte de depozitare, expresia de suprafață a CD134 uman pe celulele transfectate Sf9 de insecte a fost confirmată cu ajutorul CD134 anti-uman de șoarece, conjugat cu ficoeritrină (PE) (clona ACT35, BD Biosciences) și citometrie în flux.

(b) Imunizarea și generarea anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece
 Șoarecii BALB/c (femele, vârsta de 6 săptămâni; Laboratoarele Charles River) au fost injectați subcutanat cu ≈ 400 μl lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman (250 μl lizat celular din proba de analizat + 250 μl de Adjuvant Complet Freund; Sigma) în ziua 0. Injecții subcutanate similare cu lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman și Adjuvant Incomplet Freund (Sigma) au fost administrate în ziua 21 și ziua 42. Injecții de rapel intraperitoneale cu lizate celulare Sf9 de insecte, transfectate cu CD134 uman (250 μl/șoarece), fără adjuvant s-au dat în ziua 61 și în ziua 62. În ziua 65, splenocitele de la șoarecii imunizați au fost fuzionate cu celulele mielomice SP2/0 (ATCC), folosind tehnologia hibridomului standard, descrisă inițial de Kohler și Milstein (Nature 1975; 256: p495-497). Hibridoamele, care au produs anticorpi (clasa IgG de șoarece) împotriva CD134 uman (sortat cu testul convențional ELISA și tehnici de citometrie în flux, folosind o proteină de fuziune CD134 recombinant uman: Fcγ uman (R&D Systems) și celulele T blaste CD4, PHA-stimulate, ce exprimă CD134 uman (Roche) (a se vedea Exemplul 2 de mai jos) ca ținte, respectiv au fost extinse, crioconservate și clonate prin limitarea diluției. Anticorpii monoclonali specifici anti-CD134 uman au fost purificați, folosind coloane de proteină G (GE Healthcare), și au avut ca rezultat clona 12H3 a anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece (izotip IgG1κ de șoarece; determinat cu Setul Izotipului Anticorpului Monoclonal de Șoarece IsoStrip™ de la Roche) și clona 20E5 (izotipul IgG1κ de șoarece; idem).

Exemplul 2 Caracterizarea citometrică în flux a clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman la șoareci

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

Celulele umane mononucleare din sângele periferic (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat), au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, 1-2x10⁶ PBMC/ml în mediu de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% de ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml de gentamicină (Gibco), au fost suplimentate cu 0; 0,1; 1,0 sau 10,0 μg/ml de fitohemaglutinină-M (PHA-M; Roche) la temperatura de 37°C/5% CO₂ timp de 1...3 zile. După cultivare, PBMC au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție salină tamponată cu fosfat refrigerată, conținând 0,1% albumină serică bovină (Sigma)/0,05% NaN₃ (PBS/BSA/NaN₃), suplimentată cu 10% rezervă de ser uman (HPS; blocarea receptorilor Fcγ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 10 μg/ml clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, disponibilă comercial (șoarece izotip IgG1, BD Biosciences, Alphen aan de Rijn, Olanda) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost ulterior incubate cu 1:200 anticorpi IgG anti-șoarece de capră, PE-conjugați și diluați (Jackson ImmunoResearch) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate cu 1:20 anticorp anti-CD3 uman de șoarece, conjugat cu izotiocianat diluat de fluoresceină (FITC) (BD Biosciences) pentru a detecta limfocitele T timp de 30 de min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

Așa cum este arătat în figura 1 (n = 1 de la fiecare donator), limfocitele T umane nestimulate/în repaus, derivate din sângele periferic, nu au exprimat nici un CD134, cu toate acestea, PHA a stimulat

în funcție de doză limfocitele T umane CD3^{pozitive} pentru a exprima CD134 de suprafață. La expunerea la 10 μg/ml PHA, nivelurile de expresie ale CD134 asupra limfocitelor T umane CD3^{pozitive} activate a părut să ajungă la un platou între "ziua 1" și "ziua 2", cu toate acestea, procentul de limfocite T umane CD134^{pozitive}/CD3^{pozitive} a crescut în funcție de timp pe parcursul experimentării.

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

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 0 și 10 μg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃, suplimentată cu 10% HPS (blocarea receptorilor Fcγ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 1:10 anticorp anti-CD4 uman de șoarece diluat, conjugat cu FITC (BD Biosciences) sau cu 1:10 anticorp anti-CD8 uman de șoarece diluat, conjugat cu FITC (BD Biosciences), în combinație cu 1:10 clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, diluată, PE-conjugată, disponibilă comercial (BD Biosciences), timp de 30 minute la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

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

20 (c) Legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T care exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml timp de 2 zile; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃, suplimentată cu 10% HPS (blocarea receptorilor Fcγ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 0; 0,007; 0,02; 0,07; 0,2; 0,6; 1,9; 5,6; 16,7; 50,0 μg/mL clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, disponibilă comercial (izotip IgG1 de șoarece; BD Biosciences), și cu clona 12H3 sau clona 20E5 ale anticorpului anti-CD134 uman, generată intern, timp de 30 min la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior cu 1:200 anticorpi anti-IgG de șoarece, diluați și PE-conjugați, de capră (Jackson ImmunoResearch) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate cu 1:20 anticorp anti-CD3 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), pentru a detecta limfocitele T timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în figura 3 (media ± DS, rezultatele observate la doi donatori), clona ACT35, clona 12H3 și clona 20H5 ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece au saturat moleculele de suprafață CD134 umane pe limfocitele T CD3^{pozitive}, PHA-stimulate, la aproximativ 5,0 – 10,0 μg/mL. Folosind acești doi donatori, legarea pe jumătate maximală a fost observată la ≈ 0,5 μg/ml pentru clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, și la ≈ 2,5 μg/ml pentru clona ACT35 și clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece.

40 (d) Legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T CD4 pozitive și CD8 pozitive, ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 20 μg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃, suplimentată cu 10% HPS (blocarea receptorilor Fcγ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 20,0 μg/ml control izotip IgG1κ de șoarece (BD Biosciences) sau cu 20,0 μg/ml clonă 12H3 sau clonă 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior cu 1:100 anticorpi anti-IgG de șoarece, diluați și PE-conjugați, de capră (Jackson ImmunoResearch) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate timp de 30 min, la 4°C cu 1:20 anticorp anti-CD4 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), sau cu 1:20 anticorp anti-CD8 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), pentru a detecta subpopulațiile limfocitelor T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în figura 4, clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece au demonstrat o colorare pozitivă pe subpopulația de limfocite T CD4^{pozitive} umane activate, și o colorare slab pozitivă pe subpopulația de limfocite T CD8^{pozitive} umane activate.

(e) Competiția încrucișată a clonelor 12H3 și 20E5 nemarcate ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece cu anticorpii comerciali anti-CD134 de șoarece, PE-conjugați, pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 $\mu\text{g/ml}$ sau la 20 $\mu\text{g/ml}$ timp de 4 zile sau timp de 1 zi, respectiv; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1-2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (blocarea receptorilor Fc γ ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 20 $\mu\text{g/ml}$ clonă 12H3 nemarcată a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece sau cu 10 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 nemarcată timp de 30 min, la 4°C. Celulele au fost incubate ulterior cu 1:20 clonă ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, diluată și PE-conjugată, disponibilă comercial (BD Biosciences) sau cu clona L106 (BD Biosciences; a se vedea, de asemenea, brevetul lui Godfrey) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor anti-CD134 PE-conjugați, disponibili comercial, a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în figura 5, pre-incubarea cu clona 12H3 nemarcată a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a blocat parțial legarea clonei comerciale L106, PE-conjugate, a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la CD134 uman pe limfocitele T stimulate cu PHA. Pre-incubarea cu clona nemarcată 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a blocat ușor legarea clonei comerciale L106, PE-conjugate, a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la CD134 uman pe limfocitele T stimulate cu PHA. Pre-incubarea cu clona 12H3 și clona 20E5 nemarcate ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu a arătat nici un efect asupra legării clonei comerciale ACT35, PE-conjugate, a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la CD134 uman pe limfocitele T stimulate cu PHA.

Aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut în mod specific CD134 uman (blocarea parțială a legării clonei L106) pe limfocitele T stimulate cu PHA, și s-a legat (ii) la un epitop neidentic pe CD134 uman, care a fost recunoscut de clona comercială L106 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Aceste rezultate au demonstrat, de asemenea, că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece (i) a recunoscut în mod specific CD134 uman (blocarea ușoară a legării clonei L106) pe limfocitele T stimulate cu PHA, și (ii) s-a legat la un epitop non-identific, care a fost recunoscut de clona comercială L106 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece păreau să recunoască epitopii CD134 umani pe limfocitele T stimulate cu PHA, care au fost diferiți de epitopul recunoscut de clona comercială ACT35 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. În plus, aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece păreau să recunoască epitopi CD134 umani diferiți (acest fapt fiind demonstrat prin blocarea parțială vs. blocarea ușoară a legării L106, respectiv) pe limfocitele T stimulate cu PHA.

(f) Legarea simultană a ligandului recombinant uman OX40 și a clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 $\mu\text{g/ml}$ timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1-2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/ NaN_3 , suplimentată cu 10% HPS (blocarea receptorilor Fc γ ; BioWhittaker). Celulele au fost incubate cu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ ligand recombinant uman OX40, marcat cu polihistidină (IgG₁ de șoarece, clona AD1.1.10; R&D Systems) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate ulterior cu 1:100 anticorpi anti-IgG de șoarece, diluați și PE-conjugați, de capră (Jackson ImmunoResearch) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate cu 10,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 12H3 sau clonă 20E5 biotilate (cu utilizarea N-hidroxisuccinimidobiotinei de la Pierce) ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost incubate cu 1:100 streptavidină diluată și PE-conjugată (Jackson ImmunoResearch) timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/ NaN_3 , celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/ NaN_3 timp de 30 de minute la 4°C. Legarea OX40L uman și a anticorpilor anti-CD134 uman a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în figura 6, atât clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, cât și clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece s-au legat simultan cu OX40L uman pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Acest fapt a indicat că clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu interacționează cu epitopi în cadrul regiunii de legare a OX40L pe receptorii CD134 umani. Această

constatare vine în contrast cu clona L106, disponibilă comercial, a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (Universitatea Stanford/brevetul Godfrey EP 0 726 952 B1), care a recunoscut un epitop din regiunea de legare a OX40L uman a receptorilor CD134 umani (Taylor și Schwarz. J Immunol Methods 2001; 255: 67-72; Institutul Kirin & La Jolla/brevetul Croft WO 2007/062235 A2).

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

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

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

Exemplul 3 Caracterizarea biologică a clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece

(a) Proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, după tratamentul cu clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 0 și 10 μg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2×10^6 celule/ml în mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μg/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost însemănțate cu $0,1 \times 10^6$ celule/100 μl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning), și au fost expuse la 0; 0,025; 0,25; 2,5 sau 25,0 μg/ml clonă 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece sau clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, sau/și în combinație cu 0; 0,01; 0,1 sau 1,0 μg/ml OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența raportului molar de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂ timp de 6 zile. Peste 6 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISA™ (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în figura 8 (media ± DS, n = 4, folosind un singur donator), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece au indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a indus proliferarea la 0,25; 2,5 și 25 μg/ml. Clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a indus proliferarea la 2,5 și 25 μg/ml. În plus, OX40L uman, de asemenea, a indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. OX40L uman a indus proliferarea la 0,1 și 1,0 μg/ml. Limfocitele T umane CD134^{negative}, aflate în repaus (fără stimulare cu PHA), nu au arătat nici un răspuns proliferativ după tratamentul cu clona 12H3 a anticorpului

monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece sau OX40L uman (datele nu sunt prezentate).

După cum este arătat în figura 9 (media $\pm$ DS, $n = 2$, folosind un singur donator), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (la 2,5 și 25 $\mu\text{g/ml}$), clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece (la 2,5 și 25 $\mu\text{g/ml}$), și OX40L uman (la 1,0 $\mu\text{g/ml}$) au indus proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Lipsa tratamentului (doar mediul) sau tratamentul cu izotipul de control IgG1 κ de șoarece (la 2,5 și 25 $\mu\text{g/mL}$; BD Biosciences) nu au demonstrat nici un efect asupra proliferării limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Combinațiile dintre clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece la 2,5 și 25 $\mu\text{g/ml}$ (sau la concentrații mai scăzute; datele nu sunt prezentate) sau clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece la 2,5 și 25 $\mu\text{g/mL}$ (sau la concentrații mai scăzute; datele nu sunt prezentate) și OX40L uman la 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (sau la concentrații mai scăzute; datele nu sunt prezentate) nu au demonstrat nici un efect reciproc (adică, sinergic sau aditiv, sau chiar inhibitor) asupra proliferării limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

(b) Proliferarea limfocitelor T efectoare și T reglatoare, ce exprimă CD134 uman, stimulate de particulele sferice anti-CD3/anti-CD28 uman, după tratamentul cu clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece

Limfocitele T CD4 umane au fost purificate din PBMC prin selecție negativă, utilizând un amestec din anticorpi de șoarece (BD BioSciences), direcționat împotriva CD8 uman (clona RPA-T8), CD14 (clona M5E2), CD16 (clona 3G8), CD19 (clona 4G7), CD33 (clona P67.6), CD56 (clona B159), și CD235a (HIR2). După incubarea cu IgG anti-șoarece de berbec, conjugate cu Dynabeads® (Invitrogen), limfocitele T CD4 nelegate au fost colectate din Concentratorul de Particule Magnetice Dynal, MPC™-6 (Invitrogen). Dintre aceste limfocite T CD4 stimulate, Treg CD25^{inalt} și Teff CD25^{negativ} au fost separate prin sortarea MACS, folosind 10 μl anticorpi anti-CD25 uman de șoarece, conjugați cu microparticule sferice (Miltenyi Biotec)/10⁷ celule și coloane MiniMACS™ Magnet/MS (coloane Miltenyi Biotec VarioMACS™ Magnet/LS (Miltenyi Biotec)). Aceasta a avut ca rezultat creșteri de $> 90\%$ Teff și de $> 90\%$ Treg. Teff și Treg au fost introduse în cantitate de $0,25 \times 10^6$ celule/ml în mediul de cultură RPMI-1640/glutamax (Gibco), suplimentat cu 0,02 mM piruvat (Gibco), 100 U/ml penicilină (Gibco), 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycină (Gibco), și 10% HPS_i. Ulterior, Teff și Treg au fost înșămânțate în cantitate de $2,5 \times 10^4$ celule/200 μl /godeu (adică, $0,125 \times 10^6$ celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund (Greiner), și au fost stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/5 celule cu sau fără 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența proporției molare de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems), o combinație dintre 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și 1,0 $\mu\text{g/ml}$ OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența proporției molare de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece), sau o combinație dintre 5,0 $\mu\text{g/ml}$ clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și 1,0 $\mu\text{g/ml}$ OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența proporției molare de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece), la 37°C/5% CO₂ timp de 4 sau 5 zile. Peste 4 sau 5 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind incorporarea a 0,5 μCi timidină tritiată (Perkin & Elmer) și un calculator β (Canberra-Packard).

După cum este arătat în figura 10 (media $\pm$ DS), cu toate că particulele sferice stimulatorie CD3/CD28 au indus singure proliferarea considerabilă a Teff ce exprimă CD134 uman (adică, media), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece sau OX40L uman au indus proliferarea suplimentară a Teff ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28. Clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu a indus proliferarea suplimentară a Teff ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

După cum este prezentat în figura 11 (media $\pm$ SEM de la 5 donatori), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece nu au indus deloc sau au indus proliferarea scăzută a Treg ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28, în timp ce OX40L uman a indus o proliferare foarte puternică a Treg ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

După cum este arătat în figura 12A (media $\pm$ DS), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece în combinație cu OX40L uman nu a demonstrat nici un efect reciproc (adică, inhibitor, sinergic sau aditiv) asupra Teff ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28. Mai mult decât atât, clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece în combinație cu OX40L uman nu a demonstrat nici un efect reciproc (adică, inhibitor, sinergic sau

aditiv) asupra Teff ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (datele nu sunt prezentate).

După cum este arătat în figura 12B (media $\pm$ DS), în contrast cu acel (lipsa oricărui) efect observat la răspunsurile proliferative, mediate de OX40L uman, asupra Teff ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28, clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a suprimat puternic răspunsurile proliferative, mediate de OX40L uman, asupra Treg ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28.

(c) Funcția supresoare a limfocitelor T reglatoare, ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice anti-CD3/anti-CD28 uman după tratamentul cu clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece

Limfocitele T CD4 umane au fost purificate din PBMC, iar Teff și Treg au fost stimulate conform Exemplului 3(b), descris mai sus. Teff și Treg au fost introduse în cantitate de $0,25 \times 10^6$ celule/ml în mediul de cultură RPMI-1640/glutamax (Gibco), suplimentat cu 0,02 mM piruvat (Gibco), 100 U/ml penicilină (Gibco), 100 μ g/ml streptomycină (Gibco), și 10% HPS_i. Ulterior, Teff și Treg au fost însemănțate în cantitate de $2,5 \times 10^4$ celule/200 μ l/godeu (adică, $0,125 \times 10^6$ Teff/ml) și co-cultivate cu $2,5 \times 10^4$ Treg supresoare/200 μ l/godeu (adică, $0,125 \times 10^6$ Treg/ml; raportul Teff:Treg = 1:1) în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund (Greiner). Aceste co-culturi Teff/Treg au fost stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/10 celule cu sau fără 5,0 μ g/ml clonă 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, 5,0 μ g/ml clonă 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și 1,0 μ g/ml OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența proporției molare de 1:5 a anticorpului anti-polihiștidină de șoarece; R&D Systems), la 37°C/5% CO₂, timp de 5 zile. Peste 5 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind incorporarea a 0,5 μ Ci timidină tritiată (Perkin & Elmer) și un calculator β (Canberra-Packard).

După cum este arătat în figura 13 (media $\pm$ DS), Treg umane au suprimat răspunsurile proliferative ale Teff umane, induse de particulele sferice CD3/CD28 (adică, media). Această funcție de supresie a Treg umane a fost redusă în prezența clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman sau în prezența OX40L uman. Clona 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman nu a demonstrat nici un efect asupra funcției de supresie a Treg umane.

Exemplul 4 Caracterizarea moleculară genetică a clonelor 20E5 și 12H3 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece

(a) Izotiparea și degradarea Edman

Clasa imunoglobulinei de șoarece, izotipul și tipul catenei ușoare în cazul clonelor 20E5 și 12H3 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece, purificați de Proteina G, s-au determinat, folosind Setul pentru Izotipul Anticorpului Monoclonal de Șoarece IsoStrip™ (Roche), și a fost arătat că ambele clone 20E5 și 12H3 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece erau IgG1 de șoarece cu lanțuri ușoare κ .

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

(b) RT PCR

Celulele hibridomului din clonele 20E5 și 12H3 au fost recoltate din cultura de celule. Celulele au fost spălate cu PBS, alicotate în flacoane conținând câte 5×10^6 celule, și păstrate în calitate de granule la -80°C. Granulele de celule au fost folosite pentru a izola ARN, folosind Mini Setul pentru Izolare RNeasy (QIAGEN). A fost determinată concentrația de ARN (A260 nm) și ARN a fost depozitat la -80°C. Producerea totală de ARN izolat: 27,3 μ g și 58,4 μ g pentru clona 20E5 și clona 12H3, respectiv (raportul A260/A280 pentru ambele 1,9). Prin intermediul revers transcriptazei, a fost sintetizat ADNc din 1 μ g de ARN, folosind setul RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), acesta fiind depozitat la -20°C.

Pe baza izotipului (kappa/IgG1 de șoarece) și analizei de degradare Edman a clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, următorii primeri au fost desemnați pentru amplificarea regiunilor V ale clonei 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece:

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

5

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

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

Pe baza izotipului (kappa/IgG1 de șoarece) al clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece și primerilor sens aliniați la ADNc ce codifică peptidele de semnalizare la șoareci (bazați parțial pe Volumul 1 din "Ingineria Anticorpilor" Kontermann, Roland E.; Dubel, Stefan (Eds.), Springer Lab Manuals, Cea de-a 2-a ed., 2010), următorii primeri au fost desemnați pentru amplificarea regiunilor V ale clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece:

<i>Primerul nr.*</i>	<i>Secvența**</i>	<i>SEQ ID NO</i>	<i>Direcția</i>	<i>Gena</i>
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	46	antisens	mIgG1
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	47	antisens	mkappa
405	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	48	sens	peptidă semnalizare
410	ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT	49	sens	peptidă semnalizare
389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA	50	sens	peptidă semnalizare

15

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

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

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

20

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

25

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

Primerul 265 este un primer sens de degenerare (degenerare la 16), alipit la capătul N-terminal (aminoacizii 1...7) al catenei ușoare din clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, pe baza degradării Edman.

30

Primerul 416 este proiectat antisens pentru a se alipi în regiunea constantă a IgG1 de șoarece în pozițiile 111...131 (pe baza numărului de acces J00453 [versiunea J00453.1]).

Primerul 394 este proiectat antisens pentru a se alipi în regiunea constantă a genei kappa de șoarece în pozițiile 235...254 (pe baza numărului de acces V00807 [versiunea V00807.1]).

35

Primerii 389, 405 și 410 sunt primeri de degenerare (degenerare, respectiv, 2, 8 și 8), alipiți la secvențele peptidice de semnalizare a anticorpilor murini. Primerul 389 a fost proiectat pentru lanțul ușor, primerii 405 și 410 - pentru lanțul greu.

40

Primerii 201, 266, 203, 204, 259, 260 și 265 au fost utilizați în diferite combinații pentru a amplifica regiunile variabile ale clonei 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, iar primerii 416, 394, 405, 410 și 389 au fost utilizați în diverse combinații pentru a amplifica regiunile variabile ale clonei 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Au fost efectuate diferite PCR, folosind ADNc generat ale ambelor clone în calitate de model.

ADN Polimeraza Accuprime™ Pfx (Invitrogen) a fost utilizată pentru a amplifica regiunile variabile ale catenelor grele și ușoare ale celor două clone 20E5 și 12H3 ale anticorpului anti-CD134 uman de șoarece. Produsele PCR au fost analizate pe un gel de agaroză 1%. Produsele reacțiilor PCR au fost purificate pe gel și clonate în vectorul pCR-Blunt II-TOPO® pentru analiza secvenței. Din plasmidele care conțin o inserție PCR, inserțiile clonate au fost analizate prin secvențierea ADN (realizată de ServicXS BV, Leiden, Olanda sau Macrogen, Amsterdam, Olanda), folosind T7 pentru a obține secvența consens pentru regiunile V ale clonelor 20E5 și 12H3 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece. Pentru clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 de șoarece au fost obținute 11 reacții informative ale secvențelor catenei grele și 3 reacții informative ale secvențelor catenei ușoare. Pentru clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 de șoarece, au fost obținute 5 reacții informative ale secvențelor catenei grele și 3 reacții informative ale secvențelor catenei ușoare. Pe baza acestor informații, au fost determinate secvențele consens din regiunile V ale ambilor anticorpi (a se vedea SEQ ID NO 4, 5, 12 și 13).

Specificarea sau discutarea unui document aparent publicat anterior în această specificație nu ar trebui să fie în mod necesar luată ca o recunoaștere a faptului că documentul este parte a elaborărilor de ultimă oră sau a cunoștințelor generale comune.

Exemplul 5 Generarea clonelor himerice umane 20E5 și 12H3 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4/kappa și/sau IgG1/kappa (adică, schimbul domeniilor constante de șoarece cu domeniile constante IgG/kappa umane)

Pe baza regiunilor V murine determinate (a se vedea exemplul 4(b) de mai sus) ale clonelor 20E5 și 12H3 ale anticorpilor anti-CD134 de șoarece, a fost realizat un design pentru a genera versiuni umane de anticorpi himerici. Cu acest scop, secvențele ADNc optimizate ale celulelor CHO (a se vedea SEQ ID NO 20 (care codifică clona himerică 20E5 a catenei grele IgG4 uman), SEQ ID NO 21 (care codifică clona himerică 20E5 a catenei ușoare κ uman), SEQ ID NO 22 (care codifică clona himerică 20E5 a catenei grele IgG1 uman), SEQ ID NO 23 (care codifică clona himerică 12H3 a catenei grele IgG4 uman), și SEQ ID NO 24 (care codifică clona himerică 12H3 a catenei ușoare κ uman)), au fost comandate la GENEART (Regensburg, Germania), fiind codificate pentru o peptidă murină de semnalizare, urmată fie de lanțul ușor variabil, legat la regiunea constantă kappa umană, fie urmată de lanțul greu variabil, legat la regiunea constantă IgG umană. Acest design a fost realizat pentru ambii anticorpi; pentru clona 20E5, lanțul greu variabil a fost legat la regiunea constantă IgG4 umană sau IgG1 umană; pentru clona 12H3, regiunea variabilă a catenei grele a fost legată la regiunea constantă IgG4 umană. Folosind enzime de restricție corespunzătoare, moleculele de ADNc generate au fost subclonate în plasmide de expresie pcADN3.1-derivate. Anticorpii himerici au fost exprimați cu ajutorul Sistemului de Expresie FreeStyle™ MAX CHO (celule CHO-S) (Invitrogen). Anticorpii exprimați au fost purificați, folosind coloane cromatografice de afinitate a proteinei A (GE Healthcare). Pentru secvențele de aminoacizi himerici, a se vedea SEQ ID NO 25, 26, 27, 28 și 29.

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

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

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de 1...2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu 0; 0,007; 0,02; 0,07; 0,2; 0,6; 1,9; 5,6; 16,7; 50,0 μg/mL clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior cu 1:50 anticorpi anti-IgG4 uman de șoarece, diluați și FITC-conjugați (Sigma), timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate cu 1:10 anticorp anti-CD4 uman de șoarece, diluat și PE-conjugat (BD Biosciences), timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

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

(b) Legarea clonei himerice umane 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ pe limfocitele T CD4 pozitive și CD8 pozitive, ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 µg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și introduse în cantitate de $1-2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu sau fără 20,0 µg/mL clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior timp de 30 min, la 4°C cu 1:200 anticorpi anti-IgG umană de capră (Fcγ specifici), diluați și PE-conjugați (Jackson ImmunoResearch). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate timp de 30 min, la 4°C cu 1:10 anticorp anti-CD4 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), sau cu 1:10 anticorp anti-CD8 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), pentru a detecta subpopulațiile de limfocite T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

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

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

Celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat) au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, 1×10^6 PBMC/ml în mediul de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 µg/ml gentamicină (Gibco) au fost stimulate cu particule sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman de șoarece/anti-CD28 uman de șoarece (particule sferice CD3/CD28; Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/4 celule în absența sau prezența a 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană (PeproTech) la 37°C/5% CO₂ timp de 1 zi. După cultivare, PBMC au fost recoltate și introduse în cantitate de $1-2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu sau fără 20,0 µg/mL clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior cu 1:200 anticorpi anti-IgG umană de capră (Fcγ specifici), diluați și PE-conjugați (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate timp de 30 min, la 4°C cu 1:10 anticorp anti-CD4 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), sau cu 1:10 anticorp anti-CD8 uman de șoarece, diluat și FITC-conjugat (BD Biosciences), pentru a detecta subpopulațiile de limfocite T. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

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

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

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

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 µg/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2×10^6 celule/ml în mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 µg/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost însemănțate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 µl/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning), și au fost expuse la 25,0 µg/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ sau la 25,0 µg/ml anticorp uman de control anti-CD40 uman IgG4κ (PG102; Pangenetics), sau la 1,0 µg/ml OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența raportului molar de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile. Peste 6 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISATM (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la 450 nm.

După cum este arătat în figura 15 (media ± DS), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4κ (hu20E5) și OX40L uman au indus proliferarea limfocitelor T ce exprimă

CD134 uman, PHA-stimulate. Lipsa tratamentului (doar mediul) sau tratamentul cu anticorpus uman de control anti-CD40 uman IgG1 κ (hulG4) nu au demonstrat nici un efect asupra proliferării limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

(b) Proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, după tratamentul cu clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4 κ în combinație cu OX40L uman recombinant

Au fost generate limfocite T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate (la 10 μ g/ml timp de 1 zi; a se vedea mai sus). Celulele au fost recoltate și suspendate în cantitate de 2×10^6 celule/ml în mediul de cultură RPMI (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μ g/ml gentamicină (Gibco). Celulele au fost însemănțate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 μ l/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning), și au fost expuse la 0; 0,025; 0,25; 2,5 sau 25,0 μ g/ml clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ sau/și în combinație cu 0; 0,01; 0,1 sau 1,0 μ g/mL OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența raportului molar de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂, timp de 6 zile. Peste 6 zile, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISA™ (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în figura 16 (media $\pm$ DS), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ (hu20E5) și OX40L uman au indus dozo-dependent proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ a indus donator-dependent proliferarea la fie 2,5 și 25 μ g/mL (donator 1), fie la 0,25; 2,5 și 25 μ g/mL (donator 2). În plus, OX40L uman a indus donator-dependent proliferarea la fie 0,1 și 1,0 μ g/ml (donator 1), fie la 0,01; 0,1 și 1,0 μ g/ml (donator 2).

După cum este arătat în figura 17 (media $\pm$ DS), combinația dintre clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ (hu20E5) la 2,5 și 25 μ g/ml (sau la concentrații mai scăzute; datele nu sunt prezentate) și OX40L uman la 0,1 și 1,0 μ g/ml (sau la concentrații mai scăzute; datele nu sunt prezentate) nu a demonstrat nici un efect reciproc (adică, sinergic sau aditiv, sau chiar inhibitor) asupra proliferării limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate.

(c) Proliferarea limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particulele sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman/anti-CD28 uman, după tratamentul cu clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4 κ

Celulele mononucleare din sangele periferic uman (PBMC) de la donatori sănătoși (consimțământ informat) au fost izolate prin centrifugare de densitate pe Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed). Ulterior, PBMC au fost însemănțate în cantitate de $0,1 \times 10^6$ celule/100 μ l/godeu (adică, 1×10^6 celule/ml) în plăci cu 96 de godeuri cu fund plat (Corning) în mediul de cultură RPMI-1640 (Gibco), conținând 10% ser fetal de vițel (Bodinco) și 50 μ g/ml gentamicină (Gibco), și au fost stimulate cu particule sferice stimuloare ale anticorpului anti-CD3 uman de șoarece/anti-CD28 uman de șoarece (particule sferice CD3/CD28; Invitrogen) în cantitate de 1 particulă sferică/2 celule în absența sau prezența a 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană (PeproTech) la 37°C/5% CO₂. Peste 1 sau 2 zile, aceste limfocite T ce exprimă CD134 uman, stimulate cu particule sferice CD3/CD28 (minus și plus interleukina-2), au fost expuse la 25,0 μ g/mL clonă himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ sau la 1,0 μ g/mL OX40L uman recombinant, marcat cu polihistidină (în prezența raportului molar de 1:5 a anticorpului anti-polihistidină de șoarece; R&D Systems) la 37°C/5% CO₂ timp de 6 zile sau timp de 5 zile, respectiv. Celulele care au fost inițial stimulate cu combinația dintre particule sferice CD3/CD28 și interleukină-2 recombinantă umană, au fost stimulate în mod repetat cu 1 zi înainte de măsurările proliferării celulelor cu 25 U/ml de interleukină-2 recombinantă umană. Peste 6 zile sau peste 5 zile de expunere la clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ sau la OX40L uman recombinant, proliferarea celulelor a fost măsurată, folosind Proliferarea colorimetrică (incorporarea BrdU) a Celulelor ELISA™ (Roche) și un cititor ELISA (BioRad) la A450 nm.

După cum este arătat în figura 18 (media $\pm$ DS, n=3, folosind un singur donator), deși particulele sferice stimuloare CD3/CD28 au indus singure o proliferare considerabilă a limfocitelor T ce exprimă CD134 uman (adică, mediul), clona himerică umană 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman IgG4 κ (hu20E5) și OX40L uman au indus o proliferare suplimentară a limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, stimulate cu ajutorul particulelor sferice CD3/CD28. Se pare că adăugarea interleukinei-2 doar a crescut proliferarea bazală (adică, mediul) în cazul limfocitelor T ce exprimă CD134 uman, stimulate cu ajutorul particulelor sferice CD3/CD28.

(d) Răspunsurile imunostimuloare la maimuțele Macac Rhesus după tratamentul cu clonele umane (himerice) 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman

Primatele non-umane, maimuțele Macac Rhesus, pot fi imunizate cu proteina virusului de imunodeficiență simiană, gp130 (Weinberg et al. J. Immunother, 29, 2006, p. 575-585).

Se așteaptă ca ganglionii limfatici regionali de la maimuțele imunizate, tratate cu clonele umane (de exemplu, himerice sau imunizate, sau deimunizate; de exemplu, subclasele umane IgG1 sau IgG4) 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman, să fie măriți, comparativ cu maimuțele imunizate de control. Se așteaptă ca maimuțele tratate cu clonele umane (de exemplu, himerice sau imunizate, sau deimunizate) 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman să prezinte creșterea titrurilor de anticorpi gp130-specifici și răspunsuri crescute de lungă durată ale celulelor T, în comparație cu loturile de control. Nu ar trebui să existe semne evidente de toxicitate la maimuțele tratate cu clonele umane (de exemplu, himerice sau imunizate, sau deimunizate) 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman.

Exemplul 8 Caracterizarea domeniilor și epitopilor CD134 uman, recunoscuți de clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece

(a) Legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece cu proteina redusă și neredusă de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman (western blotting)

Au fost supuse electroforezei 1300 sau 650 ng/bandă (pentru colorarea cu albastru brilliant de Coomassie) sau 250 ng/bandă (pentru western blotting) de proteină de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman (IgG1) (R&D Systems), folosind geluri Tris-bis de 4-12% și soluție-tampon continuu MOPS (Invitrogen), într-o varietate de condiții de non-reducere și de reducere (a se vedea figura 19-A) în sistemul prefabricat LDS-PAGE de electroforeză de denaturare NuPage® Novex®. Ulterior, proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman a fost fie colorată cu albastru brilliant de Coomassie (BioRad), fie supusă electro-blotting-ului pe o membrană de transfer din fluorură de poliviniliden (PDVF) (Millipore). După blocarea cu fracțiunea V PBS/0,05% Tween 20/1% BSA (Roche) timp de 20 min la temperatura camerei, membranele PDVF au fost incubate cu 100 ng/ml clonă 12H3 sau 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece timp de 1 oră la temperatura camerei. În paralel, în calitate de control negativ, au fost folosite 100 ng/ml de anticorp de control izotip IgG1κ de șoarece (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, legarea clonei 12H3 sau 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece a fost determinată cu 1:5000 anticorpi diluați de capră Fcγ-specifici anti-șoarece, conjugați cu peroxidază de hrean (Jackson ImmunoResearch), timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o soluție gata pentru utilizare a substratului TMB (Sigma) pentru detectarea colorimetrică.

După cum este arătat în figura 19-B, proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman în condiții de non-reducere (și denaturante LDS fără și cu denaturare termică, condiția a și b, respectiv) a demonstrat o masă moleculară de ≈ 130-140 kDa. Non-reducerea, fără încălzire (condiția a), a arătat două benzi din imediata apropiere, ceea ce a sugerat faptul că o fracțiune din proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman a fost incomplet denaturată/desfășurată. Non-reducerea, cu încălzire (condiția b), a arătat o bandă, ceea ce a sugerat faptul că proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman a fost complet denaturată/desfășurată. Proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția c și d, respectiv) a avut ca rezultat benzi de ≈ 110 kDa (condiția c) și de ≈ 60-65 kDa (condiția d). Observațiile anterioare au sugerat reducerea incompletă a proteinei de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman, iar observațiile ulterioare au sugerat reducerea completă/ruperea punților disulfidice, care unesc două fragmente Fcγ umane IgG1- derivate în fiecare moleculă a proteinei de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman.

După cum este arătat în figura 19-C, ambele clone 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece au recunoscut proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman în condiții de non-reducere (și denaturante LDS fără și cu denaturare termică, condiția a și b, respectiv) la predominant ≈ 130 kDa. În contrast, clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a arătat doar o ușoară legare cu proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția c și d, respectiv), în timp ce clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a arătat o legare puternică cu proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcγ uman în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică, condiția c și d, respectiv).

Aceste rezultate atestă, că clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece au recunoscut în mod specific CD134 uman. Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 și clona 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece păreau să recunoască diferiți epitopi ai CD134 uman, ceea ce este demonstrat prin respectiva legare ușoară (clona 12H3) vs. legarea

puternică (clona 20E5) cu proteina de fuziune a CD134 uman recombinant: Fcy uman în condiții de reducere (și denaturare LDS fără și cu denaturare termică). Aceste rezultate au sugerat faptul că clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut un epitop pe CD134 uman, care nu este sensibil la denaturare (tratament termic și cu LDS) și este sensibil la reducere (adică, ruperea punții (-ilor) disulfidice de către DTT - cel mai probabil, legate de domeniile bogate în cisteină (CRD)). Aceste rezultate au sugerat faptul că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut un epitop pe CD134 uman, care nu este sensibil la denaturare (tratament termic și cu LDS) și nu este sensibil la reducere (adică, ruperea punții (-ilor) disulfidice de către DTT - cel mai probabil, legate de CRD).

(b) Legarea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece cu structura umană de CD134 cu lungime completă și diferite structuri trunchiate ale CD134 uman, exprimate pe linia celulară 293-F (cartografierea domeniilor)

Pentru a analiza specificitatea fină a clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece, localizarea epitopului (-ilor) recunoscuți de către clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece a fost determinată prin cartografierea domeniilor. Capacitatea clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de șoarece de a se lega la structurile trunchiate de CD134 uman, exprimat pe suprafața celulelor 297-F (HEK-derivate), a fost determinată prin analiza FACS.

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

Primerul nr.*	Secvența	SEQ ID NO	Direcția	Gena
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	sens	leader CD134
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGGCCA	55	antisens	capăt CD134
364	ACTGTCACTGGACCCTGCGGTCCC	52	sens	CRD2

365	GGGACCGCAGGGTCCAGTGACAGT	53	antisens	CRD2
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	sens	CRD3
367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	antisens	CRD3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCT	57	sens	CRD4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	antisens	CRD4
370	ACTGTCACTGGATGCACCCTGGCT	59	sens	CRD4 trunchiat
371	AGCCAGGGTGCATCCAGTGACAGT	60	antisens	CRD4 trunchiat

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

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

Utilizand Sistemul de Expresie FreeStyle™ 293 (Invitrogen), celulele FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) au fost transfectate tranzitoriu cu 5 variante generate de CD134 uman. Peste 48-72 h, expresia CD134 uman de suprafață pe celulele transfectate a fost analizată prin analiza FACS. În acest scop, celulele transfectate au fost recoltate și introduse în cantitate de $1-2 \times 10^6$ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu 20,0 μg/mL de clone 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali CD134 anti-uman de șoarece timp de 30 min, la 4°C. În paralel, în calitate de control negativ au fost utilizate 20,0 μg/ml de anticorp de control izotip IgG1κ de șoarece (BD Biosciences). După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate ulterior cu 1:200 anticorpi de capră anti-IgG de șoarece (Fcγ specifici), diluați și PE-conjugați (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

După cum este arătat în figura 21, ambele clone 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece au recunoscut CD134 uman cu lungime completă (notat ca structura "CRD1") pe celulele transfectate 293-F, în timp ce ambele clone 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece nu au arătat nici o legare pe celulele fals-transfectate 293-F. Mai mult decât atât, clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece au recunoscut variantele trunchiate ale CD134 uman, care nu aveau CRD1 și CRD1-CRD2 (notate ca structura "CRD2" și structura "CRD3", respectiv) pe celulele transfectate 293-F. În contrast, legarea clonei 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la varianta trunchiată de CD134 uman, care nu avea CRD3 A1-modul CRD1-CRD2-trunchiat (notată ca structura "CRD4") a fost foarte slabă, iar legarea clonei 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece la varianta trunchiată de CD134 uman, care nu avea A1-modul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 CRD1-CRD2-trunchiat [81], sau, în mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul [83]; notată ca structura "tcCRD4"), a fost complet absentă, în timp ce clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a arătat o legare puternică la varianta trunchiată a CD134 uman, care nu avea CRD3 A1-modul CRD1-CRD2-trunchiat (notată ca structura "CRD4") și la varianta trunchiată de CD134 uman, care nu avea A1-modul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 CRD1-CRD2-trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683), sau, în mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330), notată ca structura "tcCRD4").

Aceste rezultate au demonstrat faptul că clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece au recunoscut în mod specific CD134 uman (compararea transfecției CD134 uman cu lungime

completă vs. transfecție falsă). Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat faptul că clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece păreau să recunoască diferiți epitopi ai CD134 uman, ceea ce este demonstrat prin lipsa respectivă a legării (folosind clona 12H3) vs. legarea puternică (folosind clona 20E5) cu varianta trunchiată a CD134 uman, care nu avea CRD3 A1-modul CRD1-CRD2-trunchiat (notată ca structura "CRD4") și cu varianta trunchiată a CD134 uman, care nu avea A1-modul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 CRD1-CRD2-trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683), sau, în mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330), notată ca structura "tcCRD4"). Aceste rezultate au demonstrat faptul că clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu părea să recunoască un epitop al CD134 uman în CRD1 și CRD2, iar clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu părea să recunoască un epitop al CD134 uman în CRD1, CRD2, și în A1-modulul trunchiat cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 (Swiss-Prot: P43489.1) sau, în mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modul (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330). Aceste rezultate atestă, că clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece părea să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în CRD3 A1-modulul trunchiat (Swiss-Prot: P43489.1) cu secvența de aminoacizi 108...126 (adică, peptida 19-merică RCRAFTQPLDSYKPGVDCA, a se vedea SEQ ID NO 34) pe CD134 uman extracelular, sau secvența de aminoacizi 108...126 (adică, peptida 19-merică RCRAFTQPLDSYKPGVDCA, a se vedea SEQ ID NO 34), a avut un rol crucial pentru legarea la un epitop non-liniar/conformațional în CRD3 A1-modulul/CRD4 A1-B1-modulul trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683), și, posibil, în structura balama, cu secvența de aminoacizi 108...214 (vezi SEQ ID NO 35) pe CD134 uman extracelular. Aceste rezultate au demonstrat faptul că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece părea să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în CRD4 A1-modulul trunchiat (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330), și, posibil, în structura balama, cu secvența de aminoacizi 147...214 (SEQ ID NO 36) pe CD134 uman extracelular.

Folosind o cristalografie, Compaan et al. (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330) au descoperit recent implicarea critică a CRD1, CRD2 (în special a buclei A1 și a resturilor imediat următoare), și a CRD3 (în primul rând, a buclei A1) pe CD134 uman în timpul interacțiunii OX40Ligand (CD252)/CD134 (= OX40). Această descoperire vine în acord cu concluziile noastre, conform cărora (1, a se vedea mai sus), clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece nu părea să recunoască un epitop al CD134 uman în CRD1, CRD2 și A1-modulul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (Swiss-Prot: P43489.1), sau, în mod alternativ, CRD1-CRD2-CRD3 A1-B1-modulul (Compaan et al. Structure, 14, 2006, p. 1321-1330) pe CD134 uman extracelular, și (2, a se vedea mai sus) clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece s-a legat simultan cu OX40L uman pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate. Acest lucru a sugerat că clona 20E5 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece a recunoscut un epitop pe CD134 uman, care nu a avut o implicație critică în interacțiunea dintre CD134 uman și OX40L uman. Mai mult decât atât, constatările noastre, conform cărora (1, a se vedea mai sus), clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece părea să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în CRD3 A1-modulul trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683) (adică, peptida 19-merică RCRAFTQPLDSYKPGVDCA, a se vedea SEQ ID NO 34) pe CD134 uman extracelular, sau secvența de aminoacizi 108...126 (adică, peptida 19-merică RCRAFTQPLDSYKPGVDCA, a se vedea SEQ ID NO 34) a avut un rol crucial pentru legarea la un epitop non-liniar/conformațional în CRD3 A1-modulul/CRD4 A1-B1-modulul trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683), și, posibil, în structura balama, cu secvența de aminoacizi 108...214 (vezi SEQ ID NO 35) pe CD134 uman extracelular, și (2, a se vedea mai sus) clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, legată simultan cu OX40L uman pe limfocitele T ce exprimă CD134 uman, PHA-stimulate, a fundamentat ideea că epitopul (așa cum este descris mai sus) de pe CD134 uman, care a fost recunoscut de clona 12H3 a anticorpului anti-CD134 uman de șoarece, nu a avut o implicație critică în interacțiunea dintre CD134 uman și OX40L uman.

(c) Cartografierea epitopului (1) clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece cu utilizarea ELISA în cazul peptidei derivate din CD134 uman

Pentru a analiza în continuare specificitatea fină a clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, localizarea epitopului, recunoscut de clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece, a fost determinată prin cartografierea epitopului. Capacitatea clonei 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de șoarece de a se lega cu o peptidă derivată din CD134 uman, ceea ce corespundea secvenței de aminoacizi a A1-modulului cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (Swiss-Prot: P43489.1), a fost determinată prin ELISA.

Plăcile ELISA cu 96 godeuri cu fundul plat (Corning) au fost acoperite cu 10 ng/godeu de peptidă derivată din CD134 uman (sintetizată de Pepscan Presto, Lelystad, Olanda), care a corespuns secvenței de aminoacizi din A1-modulul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (vezi SEQ ID NO 38) sau cu 10 ng/godeu de peptidă umană de control, derivată din fibronectină (sintetizată de Pepscan Presto, Lelystad, Olanda), care a corespuns secvenței de aminoacizi a domeniului structural de tip suplimentar III (vezi SEQ ID NO 37) în PBS pe noapte la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, plăcile au fost blocate în BSA fracțiunea V PBS/0,05% Tween 20/1% (Roche) timp de 1 oră la temperatura camerei. Ulterior, plăcile au fost incubate cu 0; 0,00005 - 50,0 (etapele de diluare de 10 ori în tampon de blocare) µg/ml clonă 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de şoarece sau anticorp de control izotip IgG₁κ de şoarece (BD Biosciences) timp de 1 oră la temperatura camerei. După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, legarea anticorpilor a fost determinată cu 1:5000 anticorpi diluați și conjugați cu peroxidază de hrean anti-IgG de şoarece Fcγ-specifici de capră (Jackson ImmunoResearch) timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o soluție gata pentru utilizare de substrat TMB (Invitrogen) pentru detectarea colorimetrică. După adăugarea a 1 M de H₂SO₄, densitățile optice au fost măsurate la o lungime de undă de 450 nm (lungimea de undă de referință de 655 nm) cu ajutorul unui cititor de microplăci (BioRad).

După cum este arătat în figura 23-A (n=1), clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de şoarece a legat dozo-dependent și în mod specific peptida derivată din CD134 uman, în timp ce anticorpul de control izotip IgG₁κ de şoarece nu a demonstrat nici o legare la peptida derivată din CD134 uman. Atât clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de şoarece, cât și anticorpul de control izotip IgG₁κ de şoarece nu au demonstrat nici o legare la peptida umană de control, derivată din fibronectină.

Aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de şoarece a recunoscut în mod specific un epitop pe CD134 uman (compararea peptidei derivate din CD134 uman vs. peptida umană de control, derivată din fibronectină). Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat că clona 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman de şoarece părea să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în A1-modulul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683) cu secvența de aminoacizi 108...146 (adică, peptida 39-merică RCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHPSPGDNQACKPWTN, a se vedea SEQ ID NO 38) pe CD134 uman extracelular.

(d) Cartografierea epitopului (2) clonelor 12H3 și 20E5 a anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman de şoarece, utilizând Tehnologia CLIPS de Cartografiere a Epitopului cu Pepscan

Tehnologia CLIPS de Cartografiere a Epitopului cu Pepscan (Lelystad, Olanda) poate fi utilizată pentru a determina epitopii recunoscuți de către clonele 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de şoarece. Această tehnologie CLIPS permite determinarea epitopilor liniari, conformaționali, discontinui și complecși, care implică complexe proteice dimerice sau multimerice. În acest scop, secvența liniară de aminoacizi a CD134 uman = OX40 (SEQ ID NO 1) este folosită ca proteină-țintă.

Exemplul 9 Caracterizarea domeniilor și epitopilor CD134 uman, recunoscuți de către clonele himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4/kappa și/sau IgG1/kappa

(a) Legarea clonelor himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ cu structura CD134 uman cu lungime completă și diferite structuri trunchiate ale CD134 uman, exprimate pe linia celulară 293-F (cartografierea domeniului)

Pentru a analiza specificitatea față de clonele himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG 4κ și/sau IgG1κ, localizarea epitopului (-ilor), recunoscută de către clonele himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ, a fost determinată cu ajutorul cartografierii domeniului. Capacitatea clonelor himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG4κ și/sau IgG1κ de a se lega la structurile trunchiate ale CD134 uman (a se vedea Exemplul 8(b) de mai sus), exprimate pe suprafața celulelor 297-F (HEK-derivate), a fost determinată prin analiza FACS.

Utilizând Sistemul de Expresie FreeStyle™ 293 (Invitrogen), celulele FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) au fost transfectate tranzitoriu cu 5 variante generate de CD134 uman (a se vedea mai sus). Peste 48-72 h, expresia CD134 uman de suprafață pe celulele transfectate a fost analizată prin analiza FACS. În acest scop, celulele transfectate au fost recoltate și introduse în cantitate de 1-2x10⁶ celule/ml în soluție refrigerată PBS/BSA/NaN₃. Celulele au fost incubate cu sau fără 20,0 µg/mL de clone himerice umane 12H3 și 20E5 ale anticorpilor monoclonali anti-CD134 uman IgG 4κ și/sau IgG1κ timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost incubate

ulterior cu 1:200 anticorpi de capră anti-IgG de șoarece (Fcγ specifici), diluați și PE-conjugați (Jackson ImmunoResearch), timp de 30 min, la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/BSA/NaN₃, celulele au fost fixate în 2% formaldehidă în PBS/BSA/NaN₃ timp de 30 de min, la 4°C. Legarea anticorpilor a fost măsurată, folosind citometria în flux (FACSCalibur, BD Biosciences).

5 După cum este prezentat în figura 22, atât clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ și IgG1κ, cat și clona himerică umană 20E5 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ au demonstrat caracteristici de legare la diferite structuri trunchiate ale CD134 uman pe celulele transfectate, care au fost identice cu caracteristicile de legare ale omologilor lor parentali corespunzători, clonelor 12H3 și 20E5 ale anticorpilor anti-CD134 uman de șoarece (a se vedea Exemplul 8(b) de mai sus; pentru comparație, a se vedea figura 22 vs. figura 21).

(b) Cartografierea epitopului clonei himerice umane 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ de șoarece cu utilizarea ELISA în cazul peptidei derivate din CD134 uman

15 Pentru a analiza în continuare specificitatea fină a clonei himerice umane 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ, localizarea epitopului, recunoscută de către clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ, a fost determinată cu ajutorul cartografierii epitopului. Capacitatea clonei himerice umane 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ de a se lega la o peptidă derivată din CD134 uman, care a corespuns secvenței de aminoacizi a A1-modulului cu subdomeniul CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat [10], a fost determinată prin ELISA.

20 Plăcile ELISA cu 96 godeuri cu fundul plat (Corning) au fost acoperite cu 10 ng/godeu de peptidă derivată din CD134 uman (sintetizată de Pepscan Presto, Lelystad, Olanda), care corespunde secvenței de aminoacizi din A1-modulul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (vezi SEQ ID NO 38) sau cu 10 ng/godeu de peptidă umană de control, derivată din fibronectină (sintetizată de Pepscan Presto, Lelystad, Olanda), care a corespuns secvenței de aminoacizi a domeniului structural de tip suplimentar III (vezi SEQ ID NO 37) în PBS pe noapte la 4°C. După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, plăcile au fost blocate în BSA fracțiunea V PBS/0,05% Tween 20/1% (Roche) timp de 1 oră la temperatura camerei. Ulterior, plăcile au fost incubate cu 0; 0,00005 - 50,0 (etapele de diluare de 10 ori în tampon de blocare) μg/ml clonă himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ sau anticorp uman de control anti-CD40 uman IgG4κ (Biocult) timp de 1 oră la temperatura camerei. După spălarea extensivă în PBS/0,05% Tween 20, legarea anticorpilor a fost determinată cu 1:5000 anticorpi diluați și conjugați cu peroxidază de hrean anti-IgG umană Fcγ-specifici de capră (Jackson ImmunoResearch) timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de o soluție gata pentru utilizare de substrat TMB (Invitrogen) pentru detectarea colorimetrică. După adăugarea a 1 M de H₂SO₄, densitățile optice au fost măsurate la o lungime de undă de 450 nm (lungimea de undă de referință de 655 nm) cu ajutorul unui cititor de microplăci (BioRad).

35 După cum este arătat în figura 23-B (n = 1), clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ a legat dozo-dependent și în mod specific peptida derivată din CD134 uman, în timp ce anticorpul uman de control anti-CD40 uman IgG4κ nu a demonstrat nici o legare la peptida derivată din CD134 uman. Atât clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ, cat și anticorpul uman de control anti-CD40 uman IgG4κ nu au demonstrat nici o legare la peptida umană de control, derivată din fibronectină.

Aceste rezultate au demonstrat, că clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ a recunoscut în mod specific un epitop pe CD134 uman (compararea peptidei derivate din CD134 uman vs. peptida umană de control, derivată din fibronectină). Mai mult decât atât, aceste rezultate au demonstrat că clona himerică umană 12H3 a anticorpului monoclonal anti-CD134 uman IgG4κ părea să recunoască un epitop liniar sau non-liniar/conformațional în A1-modulul cu subdomeniu CRD3 A1-modul-CRD4 trunchiat (Latza et al. Eur. J. Immunol., 24, 1994, p. 677-683) cu secvența de aminoacizi 108-146 (adică, peptida 39-merică RCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN, a se vedea SEQ ID NO 38) pe CD134 uman extracelular.

Enumerarea anexată a secvențelor face parte din această specificare.

În SEQ ID NO 1, care este secvența de aminoacizi a CD134 uman (GenBank ref CAB96543.1; aa 1...277), o peptidă de semnalizare este în regiunea aminoacizilor (aa) 1...28, iar o regiune transmembranară – în regiunea aa 215...235.

55 SEQ ID NO 61, care formează cei 11 aminoacizi N-terminali ai SEQ ID NO 5, de asemenea, prezintă interes. Aceasta este catena ușoară 20E5, echivalentă cu SEQ ID NO 3, care formează cei 11 aminoacizi N-terminali ai catenei grele 20E5.

SEQ ID NO 37 (TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGQC), secvența de aminoacizi din peptida umană, derivată din fibronectină, corespunde secvenței de aminoacizi a domeniului structural de tip suplimentar III (ED1; (Peters et al. Am. Rev. Resp. Dis., 138, 1988, p. 167-171).

LISTA SECVENȚELOR

<110> Bioceros B.V.

<120> Anticorpi ANTI-CD134 (OX40) și aplicarea acestora

<130> BIOBF/P51941PC

<150> GB 1116092.6

<151> 2011-09-16

<160> 61

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> SEMNAL

<222> (1) .. (28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (215) .. (235)

<400> 1

Met	Cys	Val	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Cys	Ala	Ala	Leu
1				5					10					15	

Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Val	Thr	Gly	Leu	His	Cys	Val
			20					25					30		

Gly	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asn	Asp	Arg	Cys	Cys	His	Glu	Cys	Arg	Pro
		35					40					45			

Gly	Asn	Gly	Met	Val	Ser	Arg	Cys	Ser	Arg	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Cys
	50					55					60				

Arg	Pro	Cys	Gly	Pro	Gly	Phe	Tyr	Asn	Asp	Val	Val	Ser	Ser	Lys	Pro
65					70					75				80	

Cys	Lys	Pro	Cys	Thr	Trp	Cys	Asn	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Lys
				85				90						95	

MD 4612 C1 2019.08.31

38

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 2
<211> 834
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența cADN de celulă de insectă Sf9 optimizată pentru
CD134 uman

<400> 2
atgtgcgtgg ggcgtcgtcg tctgggtcgt ggtccctgcg ctgctctgct gctgctgggt
60

MD 4612 C1 2019.08.31

39

ctgggcctgt ccactgtcac tggactccac tgcgtgggcg acacctaccc ctccaacgac
120
cgttgctgcc acgaatgcag gcctggcaac ggcatggtgt cccgttgctc ccggtcccag
180
aacaccgtgt gccgtccctg cgggtcccgt ttctacaacg acgtggtgtc ctccaagccc
240
tgcaagcctt gcacttggtg taacctccgc tccggttccg agcgcaagca gctgtgcacc
300
gctaccagc acactgtctg taggtgcagg gctggcacc agccctgga ctctacaag
360
cccgtgtcg actgcgtcc ctgccccct ggtcacttct ctcccggcga caaccaggct
420
tgcaaaccat ggaccaactg caccctgggt ggcaagcaca ccctgcagcc cgcttccaac
480
tcctccgacg ctatctgca ggaccgtgac cccctgcta ctcaacctca ggagactcag
540
ggtcccccg ctggtccat caccgtgcag cccaccgagg cttggccccg tacctccaa
600
ggacctagca ctaggcctgt ggaggtgcc ggtggtcgtg ctgtggctgc tatcctgggc
660
ctgggtctgg tgctgggcct gctgggtccc ctggctatcc tgotggctct gtacctctg
720
cgtcgtgacc agcgtctgcc cccgacgct cacaagcccc ctggtggtgg ttccttcgt
780
accccatcc aggaggagca ggctgacgct cactccacc tggccaagat ctaa
834

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a
lanțului greu al clonei 12H3

<400> 12

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

MD 4612 C1 2019.08.31

40

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a regiunii variabile a
lanțului ușor al clonei 12H3

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu

MD 4612 C1 2019.08.31

41

85

90

95

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

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului greu CDR1 al clonei 12H3

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului greu CDR2 al clonei 12H3

<400> 15

Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> secvența aminoacidă a lanțului greu CDR3 al clonei 12H3

<400> 16

Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val
1 5 10

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR1 al clonei 12H3

<400> 17

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala Val Ala
1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR2 al clonei 12H3

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului ușor CDR3 al clonei 12H3

<400> 19

Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 23

<211> 1404

<212> ADN

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența cADN de CHO optimizată codificatoare pentru
lanțul IgG4 al clonei himerice 12H3 umane

<400> 23

atggagtggt ctggtgtctt tatgttcctg ctgtccgtga ccgcgggtgt ccacagcgag
60

gtgcagctgc agcagtcagg cctgagctg gtgaaacctg ggcctccgt gaagatctcc
120

tgcaagacct ccggctacac cttcaaggac tacacaatgc actgggtgaa acagtccac
180

ggcaagtcct tggagtggat cggcggaatc taccccaaca acggcggtc cactacaac
240

cagaacttca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctatatg
300

MD 4612 C1 2019.08.31

43

gaatttcggt ccctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gatgggctac
360

cacggccccc acctggattt cgacgtgtgg ggcgctggca ccaccgtgac cgtgtctcca
420

gctagcacca agggcccctc cgtgttcctt ctggcccctt gctcccggtc cacctccgag
480

tctaccgccg ctctgggctg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtcc
540

tggaactctg gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgcctgtgt gcagtcctcc
600

ggcctgtact ccctgtcttc cgtggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc
660

tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct
720

aagtacggcc ctccctgccc accttgccct gccctgaat ttctggggcg accttccgtg
780

ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc
840

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccaagaagat cccgaggtcc agttcaattg gtacgtggac
900

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg aacagttcaa ctccacctac
960

cggtgtgtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag
1020

tgcaaggtct ccaacaaggg cctgcccagc tctatcgaaa agacaatctc caaggccaag
1080

ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcctccca gccagaaga gatgaccaag
1140

aaccaggtgt ccctgacttg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgccgtcgag
1200

tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc
1260

gacggctcct tcttctgtga ctctcggctg acagtggata agtcccgggtg gcaagaaggc
1320

aacgtcttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc
1380

ctgtccctga gcctgggcaa gtag
1404

MD 4612 C1 2019.08.31

44

<211> 702
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența cADN de CHO optimizată codificatoare pentru lanțul kappa al clonei himerice 12H3 umane

<400> 24
atggagtggc ccggtgtctt tatgttcctg ctgtccgtga ccgctggcgt gcactccgat
60
atcgtgatga cccagtccca caagtttatg tccacctccc tgggcgacag agtctctatt
120
acctgcaagg cctcccagga cgtggggcgt gccgtggcct ggtatcagca gaagcccggc
180
cagtccccca agctgctgat ctactgggcc tccaccagac acaccggcgt gcccgacaga
240
ttcaccggcg gaggctctgg caccgacttc accctgacaa tctccaacgt gcagtccgag
300
gacctgaccg actacttctg ccagcagtat atcaactacc ccctgacctt cggcggaggc
360
accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gctccctccg tgtttatctt cccaccctcc
420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtctgcc tgctgaacaa cttctacccc
480
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaagaa
540
tccgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgctctccac cctgaccctg
600
tccaaggccg actacgagaa gcacaaggctg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg
660
tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgt aa
702

<210> 28
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificială

<220>
<223> Secvența aminoacidă a lanțului IgG4 al clonei himerice 12H3 umane

<400> 28

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

MD 4612 C1 2019.08.31

45

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

MD 4612 C1 2019.08.31

46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Lys
465

<210> 29

<211> 233

MD 4612 C1 2019.08.31

47

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

<223> Secvența aminoacidă a lanțului kappa al clonei himerice
12H3 umane

<400> 29

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr
20 25 30

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

Gly Ala Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
50 55 60

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

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

Val Gln Ser Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn
100 105 110

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

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

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

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

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

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

MD 4612 C1 2019.08.31

48

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 30
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificială

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

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

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

<400> 30

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Pro Cys Gly Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

MD 4612 C1 2019.08.31

49

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 198

<212> PRT

<213> Artificială

<220>

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

<220>

<221> SEMNAL

<222> (1) .. (28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (136) .. (156)

<400> 31

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Arg Cys Arg Ala
20 25 30

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

Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro

MD 4612 C1 2019.08.31

50

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Ala Lys Ile
195

<210> 32

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificială

 $\langle 220 \rangle$

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

 $\langle 220 \rangle$

<221> SEMNAL

<222> (1) . . (28)

 $\langle 220 \rangle$

<221> TRANSMEM

<222> (117) .. (137)

<400> 32

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

MD 4612 C1 2019.08.31

51

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Pro Cys Pro Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ile

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

<220>
<223> Secvența aminoacidă a CD134_CRD4 umane trunchiate (aa 1-28
><

147-277)

<220>
<221> SEMNAL

MD 4612 C1 2019.08.31

52

<222> (1) .. (28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (97) .. (117)

<400> 33

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Cys Thr Leu Ala
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Asp Cys Ala

MD 4612 C1 2019.08.31

53

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

<400> 35

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

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

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

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

Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile
65 70 75 80

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

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

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

<400> 37

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

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

<210> 38
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

MD 4612 C1 2019.08.31

54

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

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

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
35

<210> 46
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primer mlgG1 antisens (primer nr.: 416)

<400> 46
cagtggatag acagatgggg g
21

<210> 47
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primer mkappa antisens (primer nr: 394)

<400> 47
actggatggt gggaagatgg
20

<210> 48
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primer sens al peptridei de semnalizare (primer nr.: 405)

<400> 48
atgggatgga gctratatcat sytctt
26

<210> 49
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primer sens al peptridei de semnalizare (primer nr.: 410)

<400> 49
atggratgga gckgggtctt tmtctt
26

<210> 50
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> primer sens al peptridei de semnalizare (primer nr.: 389)

<400> 50
atgggcwtca aagatggagt caca
24

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

<220>
<223> Primer sens al CD134 lider (primer nr.: 362)

<400> 51
ctcggatccg ccacatgtg cgtg
24

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

<220>
<223> Primer sens RD2 (primer nr.: 364)

<400> 52
actgtcactg gaccctgcgg tccc
24

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

<220>
<223> Primer antisens al CRD2 (primer nr: 365)

<400> 53
gggaccgcag ggtccagtga cagt
24

<210> 54
<211> 24

<212> ADN
<213> Artificială

<220>
<223> Primer sens al CRD3(primer nr.: 366)

<400> 54
actgtcactg gaaggtgcag ggct
24

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

<220>
<223> Primer terminal al CD134 (primer nr.: 363)

<400> 55
agaattctta ttagatcttg gccca
24

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

<220>
<223> Primer antisens al CRD3 (primer nr.: 367)

<400> 56
agccctgcac cttccagtga cagt
24

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

<220>
<223> Primer sens al CRD4 (primer nr.: 368)

<400> 57
actgtcactg gaccctgccc ccct
24

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

<220>
<223> Primer antisens al CRD4(primer nr.: 369)

<400> 58

aggggggcag ggtccagtga cagt
24

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

<220>
<223> Primer sense al CRD4 trunchiate (primer nr.: 370)

<400> 59
actgtcactg gatgcaccct ggct
24

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

<220>
<223> Primer antisense al CRD4 trunchiate (primer nr.: 371)

<400> 60
agccagggtg catccagtga cagt
24

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Secventa artificiala
<220>
<223> Secvență de aminoacizi N-terminală a catenei ușoare a
clonei
20E5

<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
1 5 10

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. WO 9942585 A1 1999.08.26
2. Al-Shamkhani et al. Eur. J. Chem. No 26, 1996, p. 1695-1699
3. Hirschhorn-Cymerman et al. J. Exp. Med. No 206, 2009, p. 1103-1116
4. US 20090214560 A1 2009.08.27
5. Morris et al. Mol. Immunol. No 44, 2007, p. 3,112-3,121

(57) Revendicări:

1. Anticorp, care se leagă la CD134 uman și anticorpul menționat nu împiedică legarea receptorului CD134 uman (OX40) la ligandul OX40 (OX40L), unde anticorpul cuprinde o regiune variabilă a catenei ușoare și o regiune variabilă a catenei grele, unde regiunea variabilă a catenei grele cuprinde:

(a) o regiune CDR1 a catenei grele, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:14 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi;

(b) o regiune CDR2 a catenei grele, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:15 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi i/sau

(c) o regiune CDR3 a catenei grele, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:16 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi, și unde regiunea variabilă a catenei ușoare cuprinde:

(a) o regiune CDR1 a catenei ușoare, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:17 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi;

(b) o regiune CDR2 a catenei ușoare, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:18 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi și/sau

(c) o regiune CDR3 a catenei ușoare, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:19 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

2. Anticorp, conform revendicării 1, care cuprinde:

(a) o regiune variabilă a catenei grele, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:12 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi și/sau

(b) o regiune variabilă a catenei ușoare, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:13 sau o variantă a acestei secvențe cu 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi.

3. Anticorp, care se leagă specific la un epitop într-o secvență de aminoacizi din domeniul extracelular al CD134 uman, la care se leagă molecula, definită în oricare din revendicările 1-2.

4. Anticorp, conform revendicării 3, care se leagă la un epitop din domeniul extracelular al CD134 uman, care conține secvența de aminoacizi a SEQ ID NO: 34 sau SEQ ID NO: 38.

5. Anticorp, conform revendicării 3 sau 4, care nu împiedică legarea receptorului CD134 uman la ligandul OX40 (OX40L) pe celulele imunocompetente umane, care exprimă CD134 uman, implicate în inhibarea creșterii celulelor tumorale umane.

6. Anticorp, conform revendicării 3 sau 4, care îmbunătățește legarea și/sau răspunsurile imunostimulatoare ale ligandului uman OX40 (OX40L) pe celulele imunocompetente umane, care exprimă CD134 uman, implicate în inhibarea creșterii celulelor tumorale umane.

7. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, care reprezintă un anticorp uman.

8. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, care reprezintă un anticorp himeric, umanizat sau Delmmunized™, sau un fragment de acesta.

9. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, care reprezintă un anticorp IgA, IgD, IgE, IgG sau IgM, cum ar fi un anticorp IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.

10. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, în care anticorpul reprezintă un fragment de legare a antigenului al unui anticorp, de exemplu, selectat din grupa constituită din: fragmente Fv (de exemplu, Fv a unei singure catene și Fv disulfidice legate); fragmente similare Fab (de exemplu, fragmente Fab, fragmente Fab' și fragmente F(ab')₂).

11. Anticorp, conform revendicării 10, în care fragmentul de legare a antigenului reprezintă scFv.

12. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, în care fragmentul de legare reprezintă un anticorp recombinant.

13. Anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente, în care fragmentul de legare reprezintă un anticorp monoclonal.

14. Moleculă de acid nucleic, care codifică un anticorp, conform oricăreia din revendicările precedente.

15. Vector, care conține cel puțin o moleculă de acid nucleic, conform revendicării 14.

16. Celulă gazdă, care conține un vector, conform revendicării 15.

17. Celulă gazdă, conform revendicării 16, care derivă de la un mamifer sau de la o insectă.

18. Metodă de preparare a unui anticorp, conform oricăreia din revendicările 1-13, care prevede etapa (i) de preparare a anticorpilor-CD134 și etapa (ii) de sortare a anticorpilor menționați pentru a identifica și obține anticorpi, care nu împiedică legarea OX40L la CD134.

19. Metodă, conform revendicării 18, în care etapa prevede identificarea anticorpilor, care leagă CD134 după expunerea CD134 la o concentrație de saturație de OX40L.

20. Metodă, conform revendicării 18 sau 19, în care anticorpii reprezintă un anticorp monoclonal și prevede imunizarea unui animal cu CD134 uman, prepararea hibridoamelor, care secretă anticorpi anti-CD134 și sortarea hibridoamelor, care produc anticorpi anti-CD134.

21. Anticorp, conform oricăreia din revendicările 1-13, sau produsă conform oricăreia din revendicările 18-20, pentru utilizare în prevenirea sau în tratarea cancerului la un subiect care necesită aceasta.

22. Anticorp pentru utilizare, conform revendicării 21, în care cancerul este selectat din grupa constituită din: cancer pulmonar, cancer de prostată, cancer mamar, cancer al capului și gâtului, cancer esofagian, cancer gastric, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de vezică urinară, cancer cervical, cancer uterin, cancer ovarian, cancer hepatic, cancer hematologic sau oricare altă boală sau tulburare caracterizată prin creșterea necontrolată a celulelor.

23. Metodă de îmbunătățire a răspunsului imun la un subiect uman, care prevede administrarea la un subiect uman a unei cantități terapeutice eficiente de anticorpi, conform oricăreia din revendicările 1-13, sau produsă conform oricăreia din revendicările 18-20, și, opțional, a unui purtător farmaceutic acceptabil.

24. Metodă, conform revendicării 23, în care îmbunătățirea răspunsului imun prevede o creștere a funcției imunostimulatoare/efectoare a celulelor T efectoare, opțional ca rezultat al proliferării acestor celule, și/sau ca rezultat al fenomenului de reglare prin reducere a funcției imunosupresoare a celulelor T reglatoare, opțional fără creșterea numărului de aceste celule.

25. Metodă de tratament a cancerului la un subiect uman, care necesită aceasta, care prevede administrarea la un subiect uman a unei cantități terapeutice eficiente de anticorpi, conform oricăreia din revendicările 1-13, sau produsă conform oricăreia din revendicările 18-20.

26. Metodă, conform revendicării 25, în care cancerul este selectat din grupa constituită din: cancer pulmonar, cancer de prostată, cancer mamar, cancer al capului și gâtului, cancer esofagian, cancer gastric, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de vezică urinară, cancer cervical, cancer uterin, cancer ovarian, cancer hepatic, cancer hematologic sau oricare altă boală sau tulburare caracterizată prin creșterea necontrolată a celulelor.

27. Metodă de reducere a dimensiunii unei tumori sau de inhibare a creșterii celulelor canceroase la un subiect, sau reducerea, sau suprimarea dezvoltării cancerului metastatic la un subiect care suferă de cancer, care prevede administrarea la un subiect uman a unui anticorp, conform oricăreia din revendicările 1-13, sau produse conform oricăreia din revendicările 18-20.

28. Compoziție farmaceutică, care conține un component de legare, conform oricăreia din revendicările 1-13, sau produs, conform oricăreia din revendicările 18-20, în asociere cu unul sau mai mulți diluanți sau excipienți farmaceutici acceptabili.

29. Compoziție, conform revendicării 28, potrivită pentru administrare parenterală unui organism uman, de exemplu, prin administrare intravenoasă, intramusculară, intradermală, intraperitoneală, intratumorală, intravezicală, intraarterială, intratecală, intracapsulară, intraorbitală, intracardiacă, transtraheală, intraarticulară, subcapsulară, subarahnoidală, intraspinală, epidurală, intrasternală sau subcutanată.

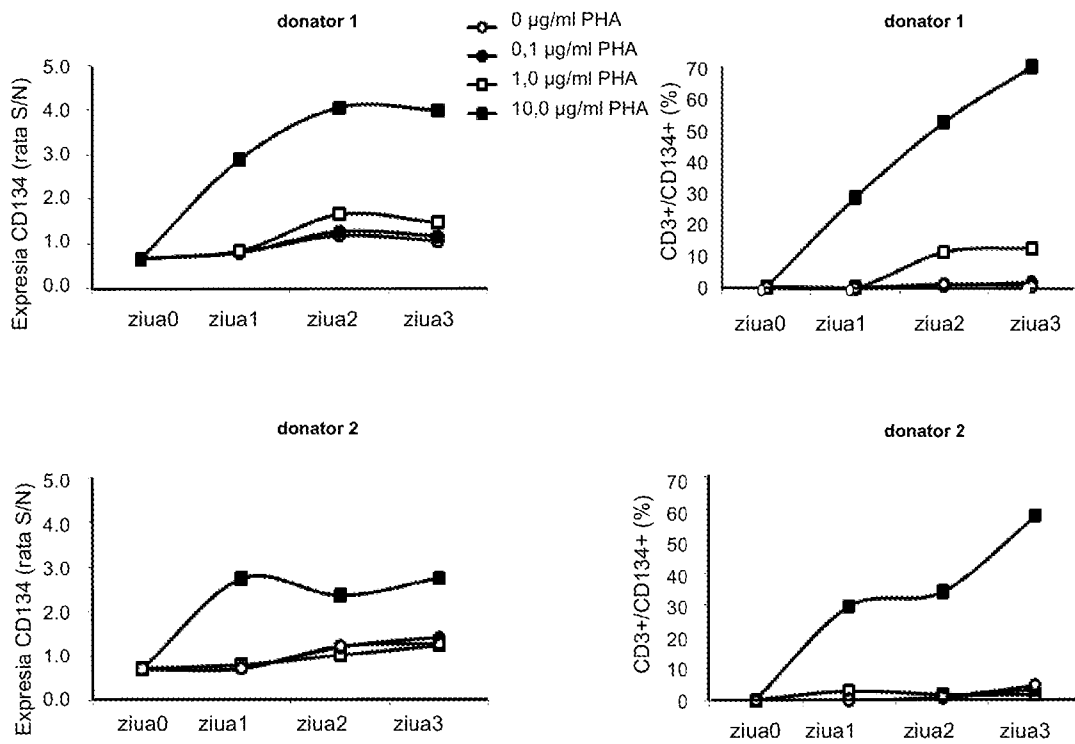


Fig. 1

Celulele T CD4 aflate în repaus

Celulele T CD4 PHA-stimulate/activate

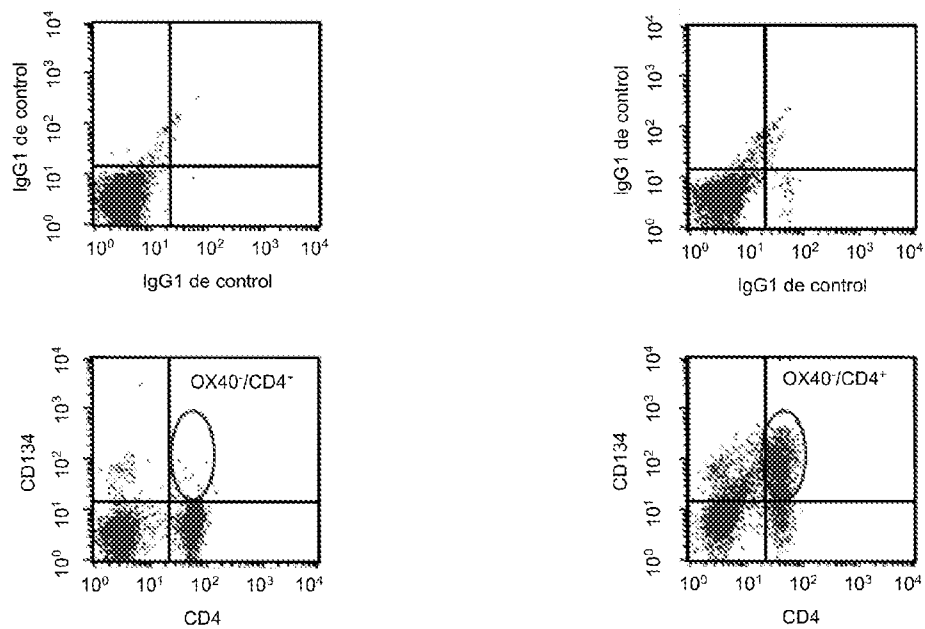


Fig. 2

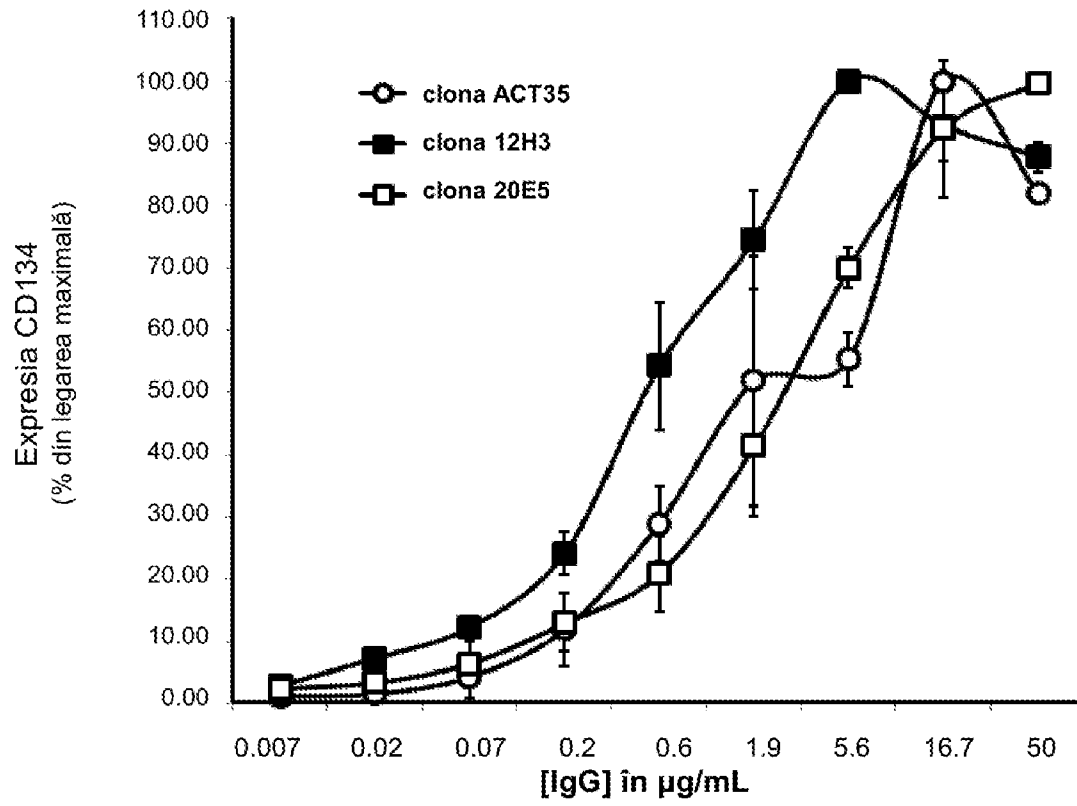


Fig. 3

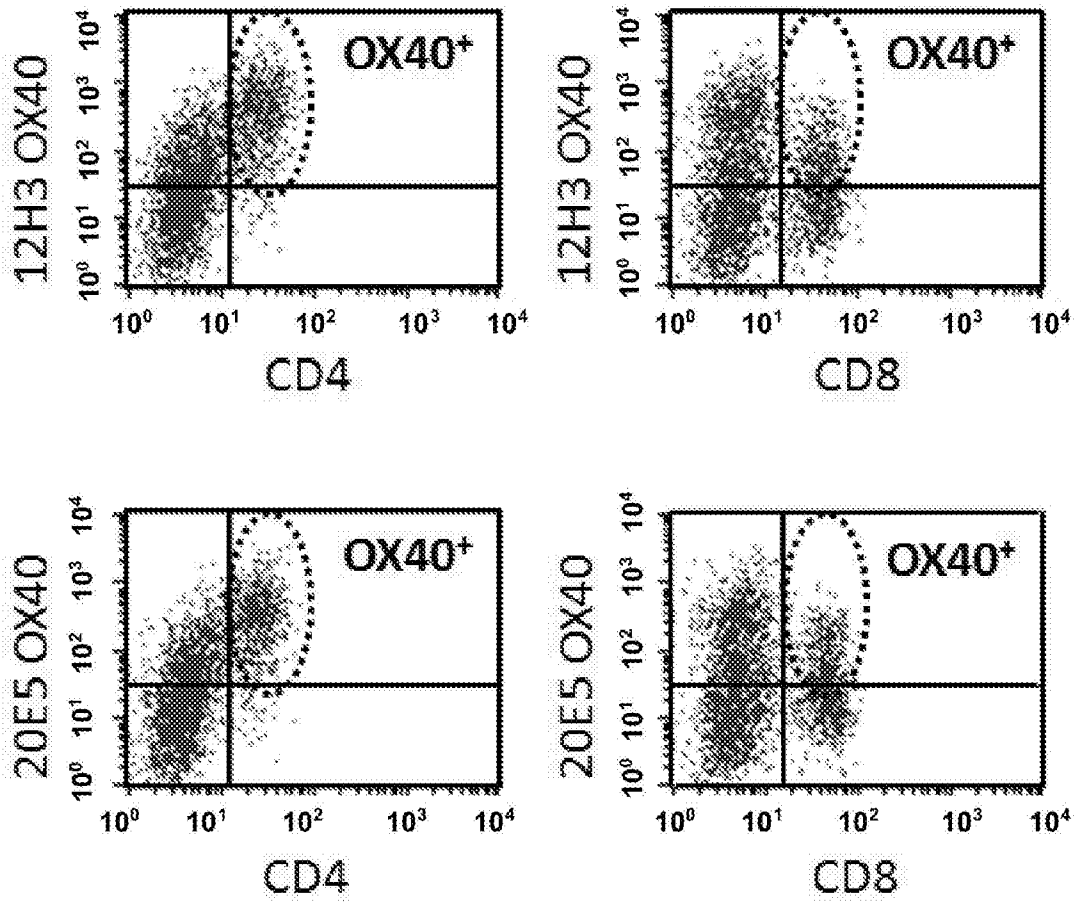


Fig. 4

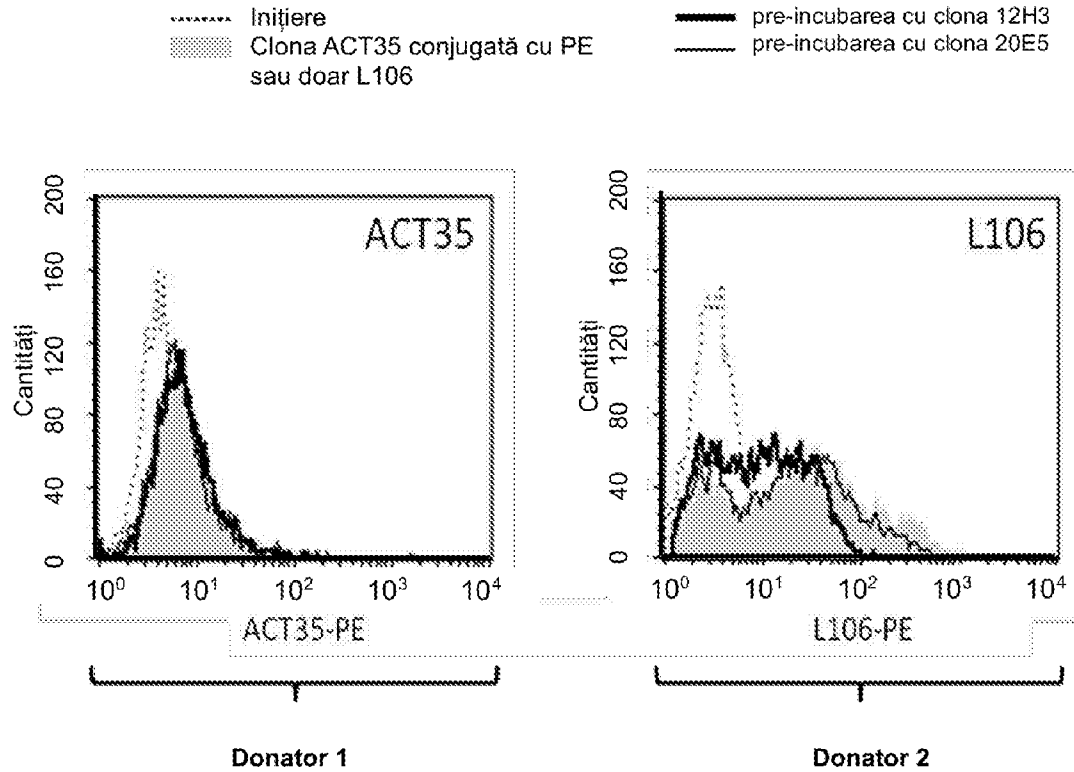


Fig. 5

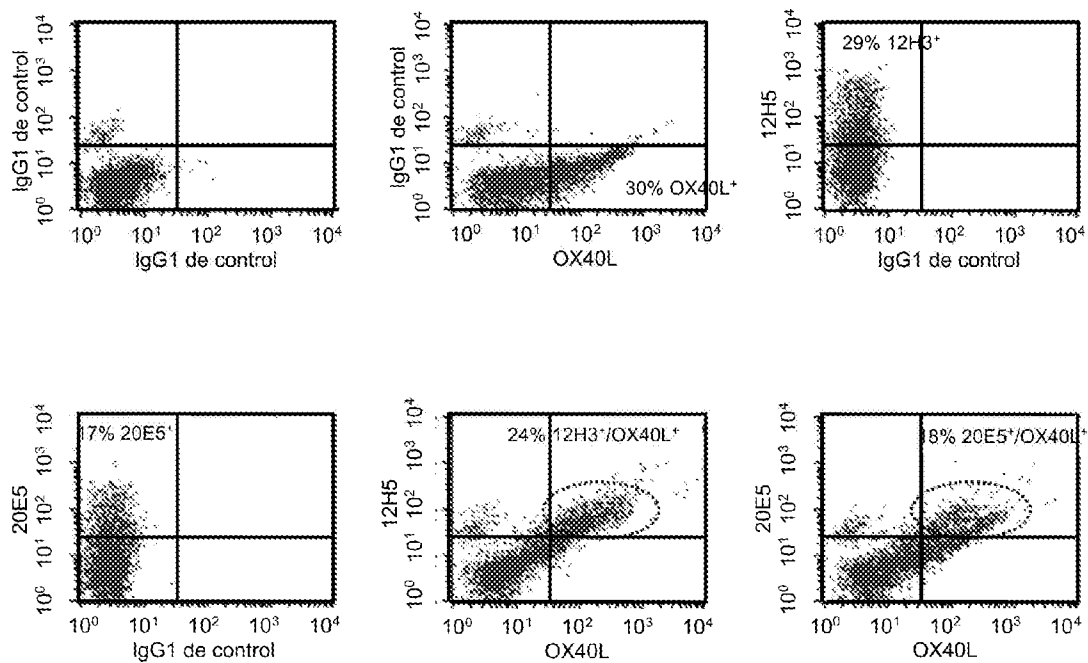


Fig. 6

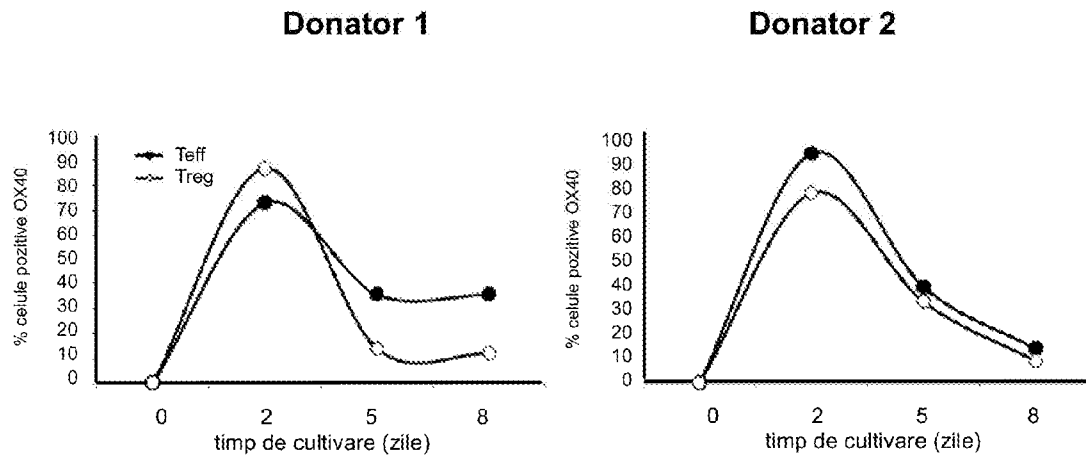


Fig. 7

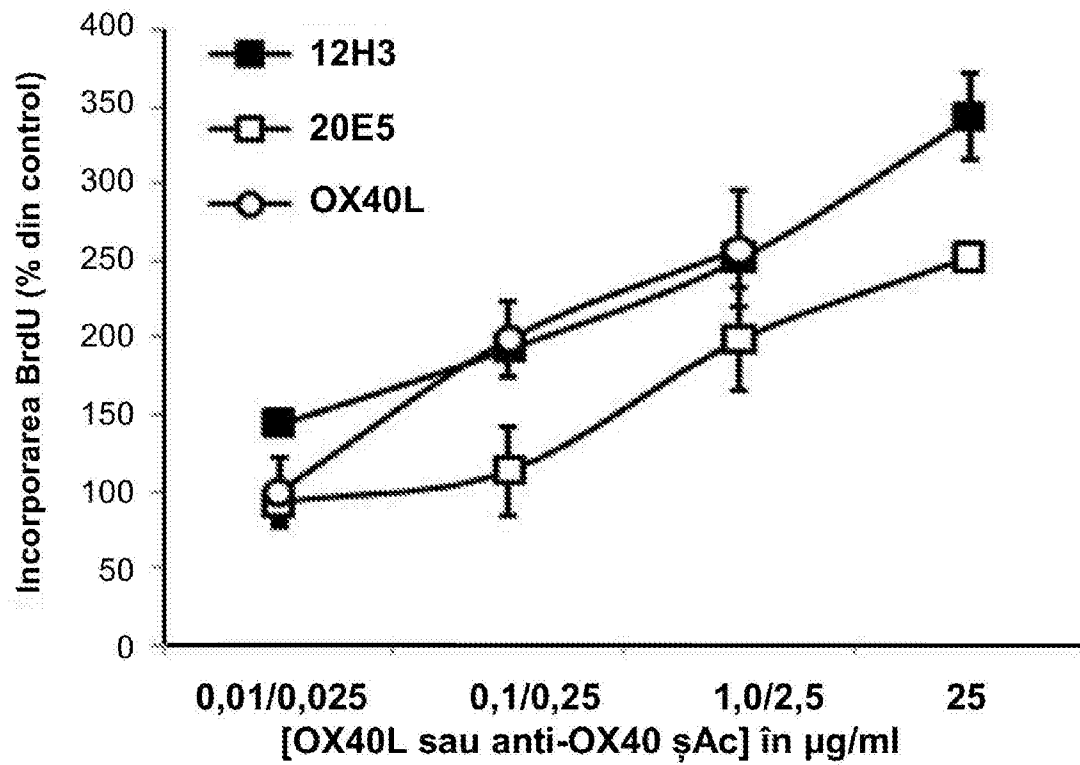


Fig. 8

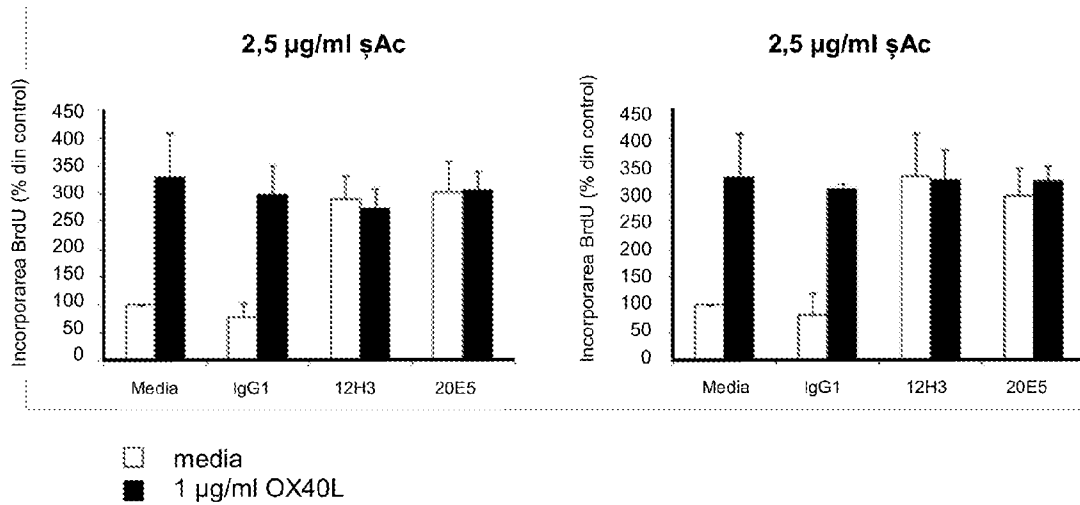


Fig. 9

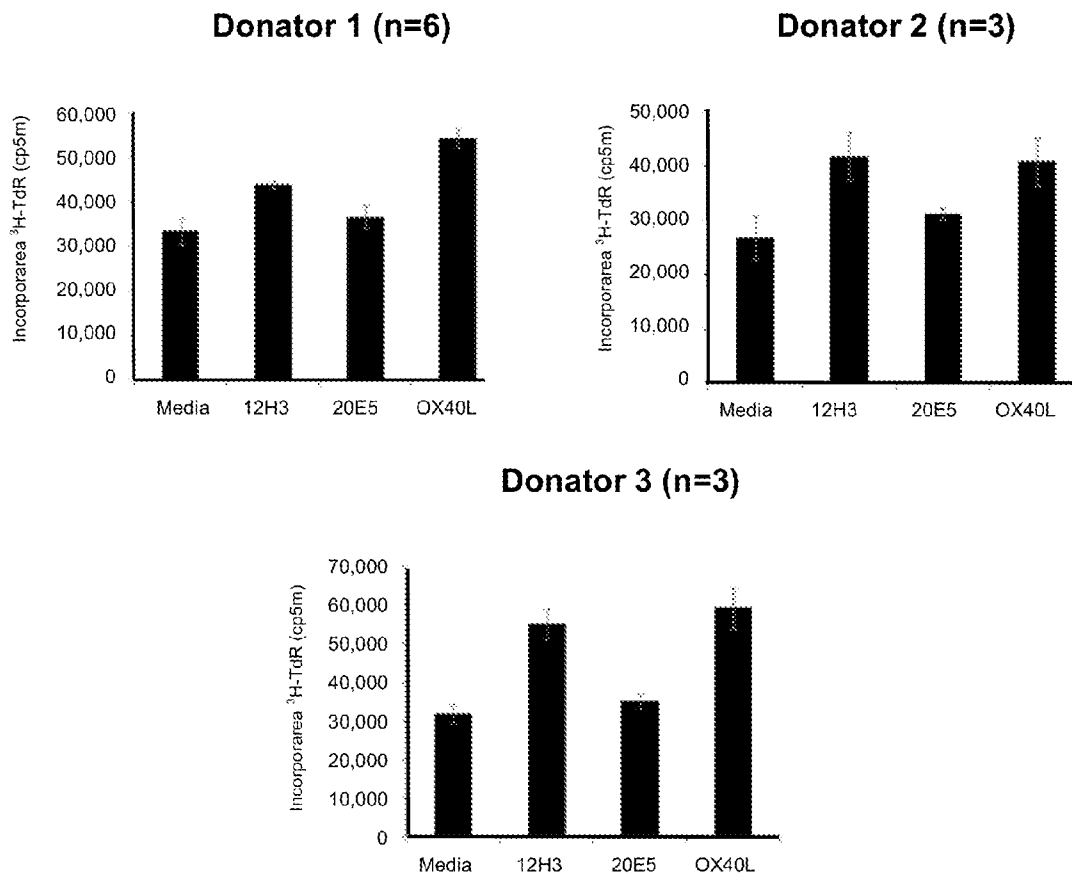


Fig. 10

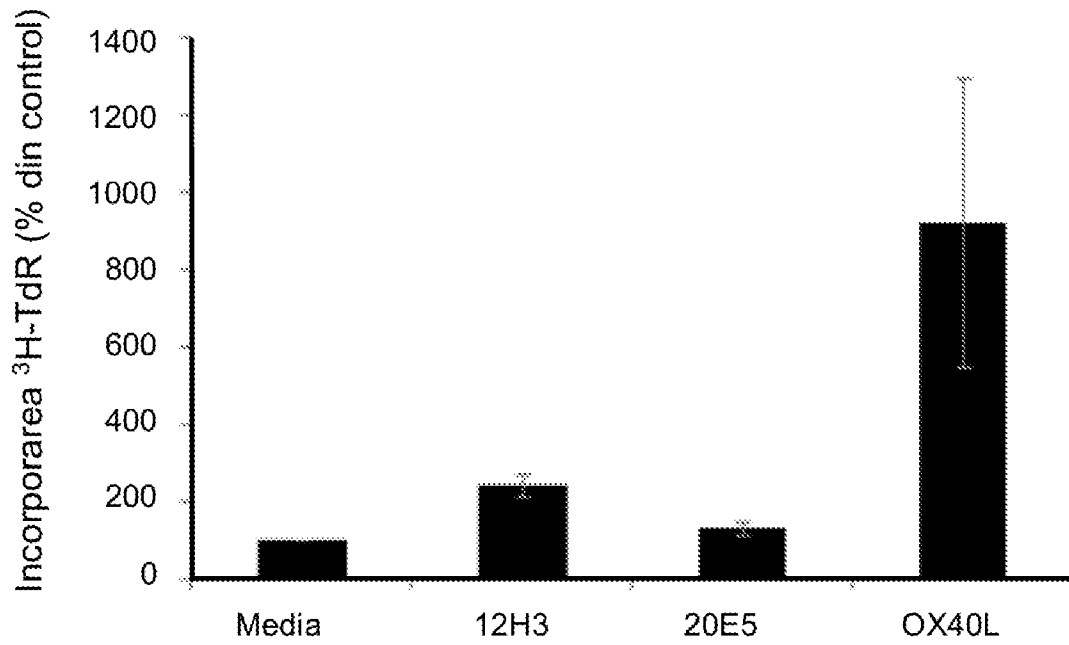


Fig. 11

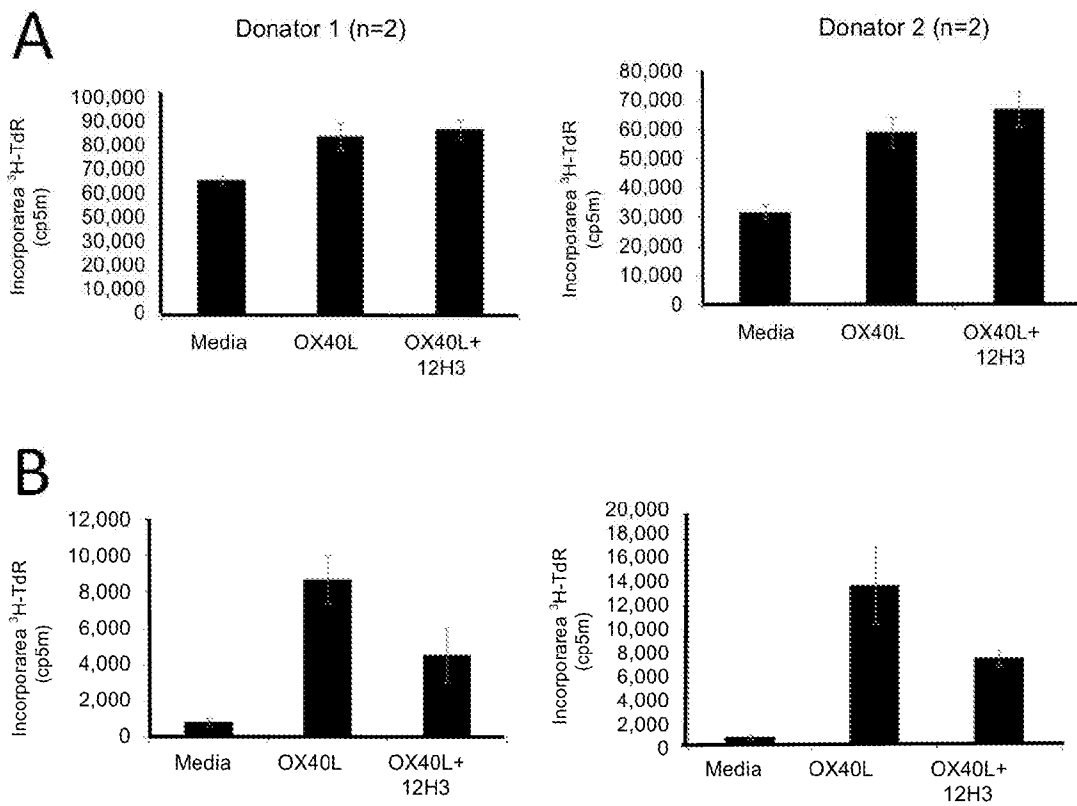


Fig. 12

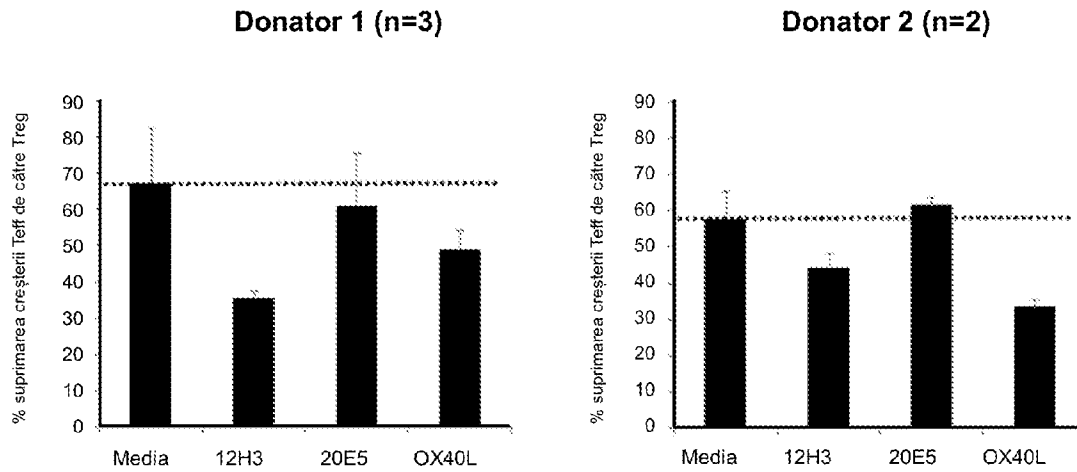


Fig. 13

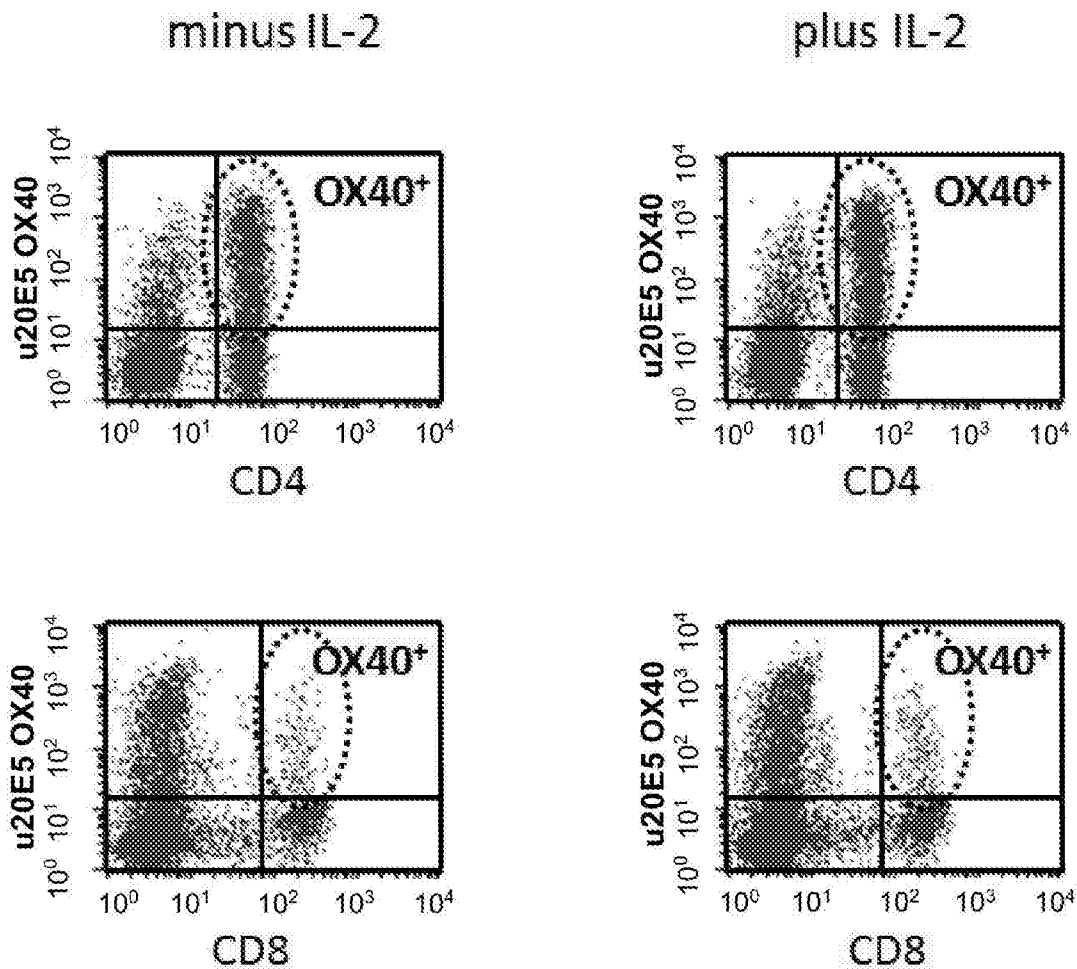


Fig. 14

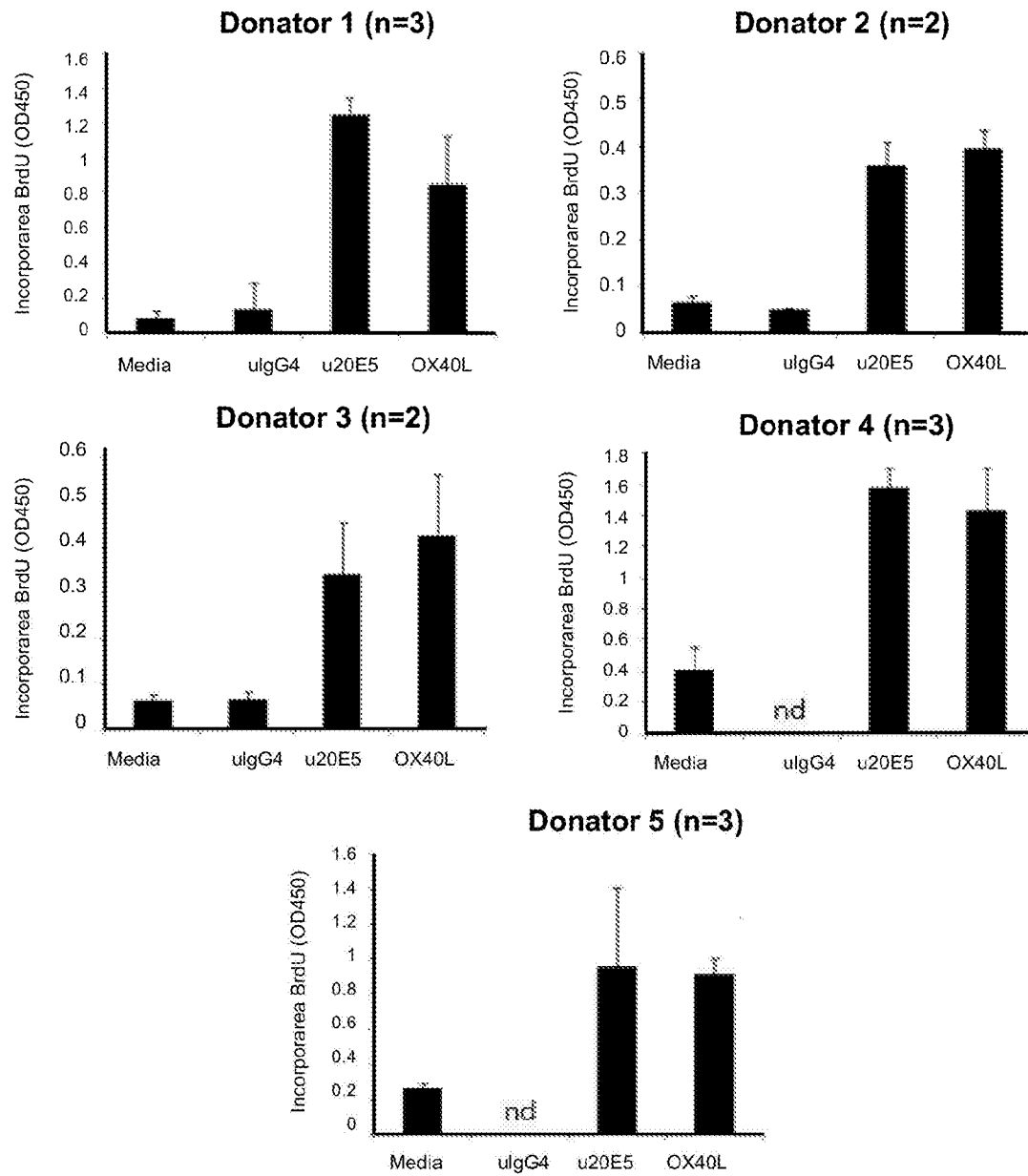


Fig. 15

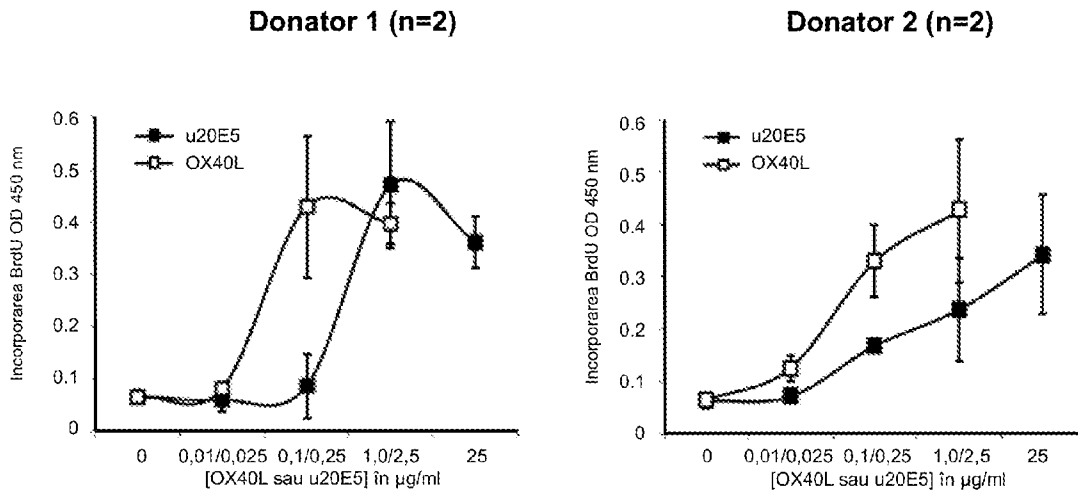


Fig. 16

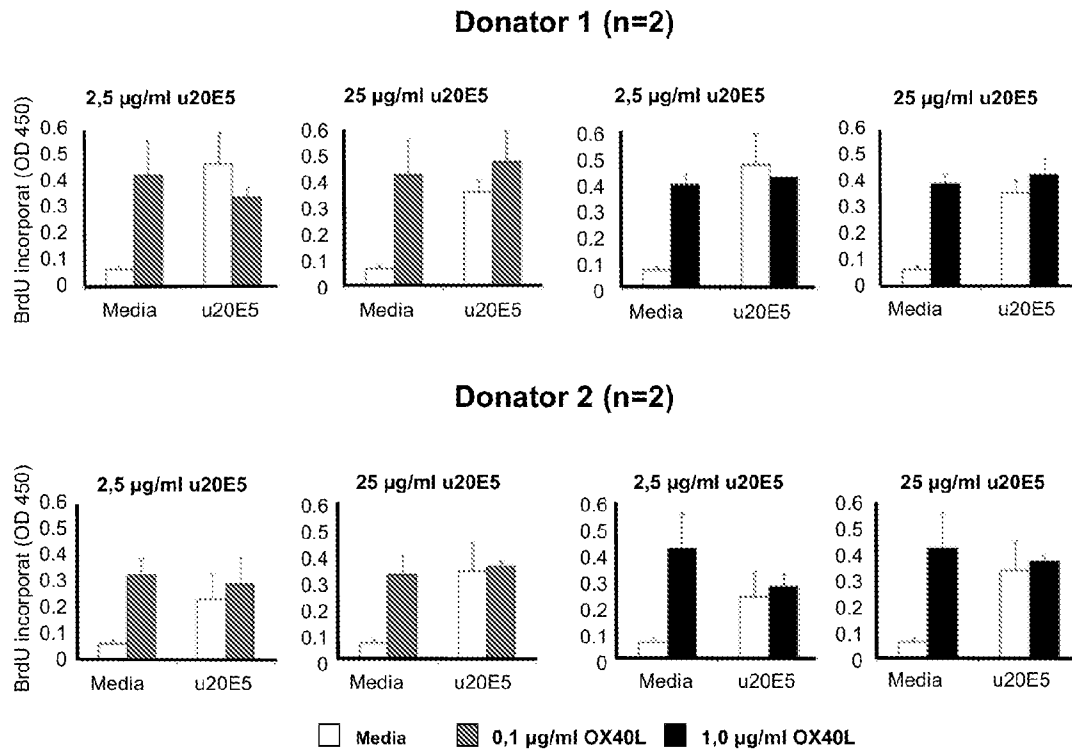


Fig. 17

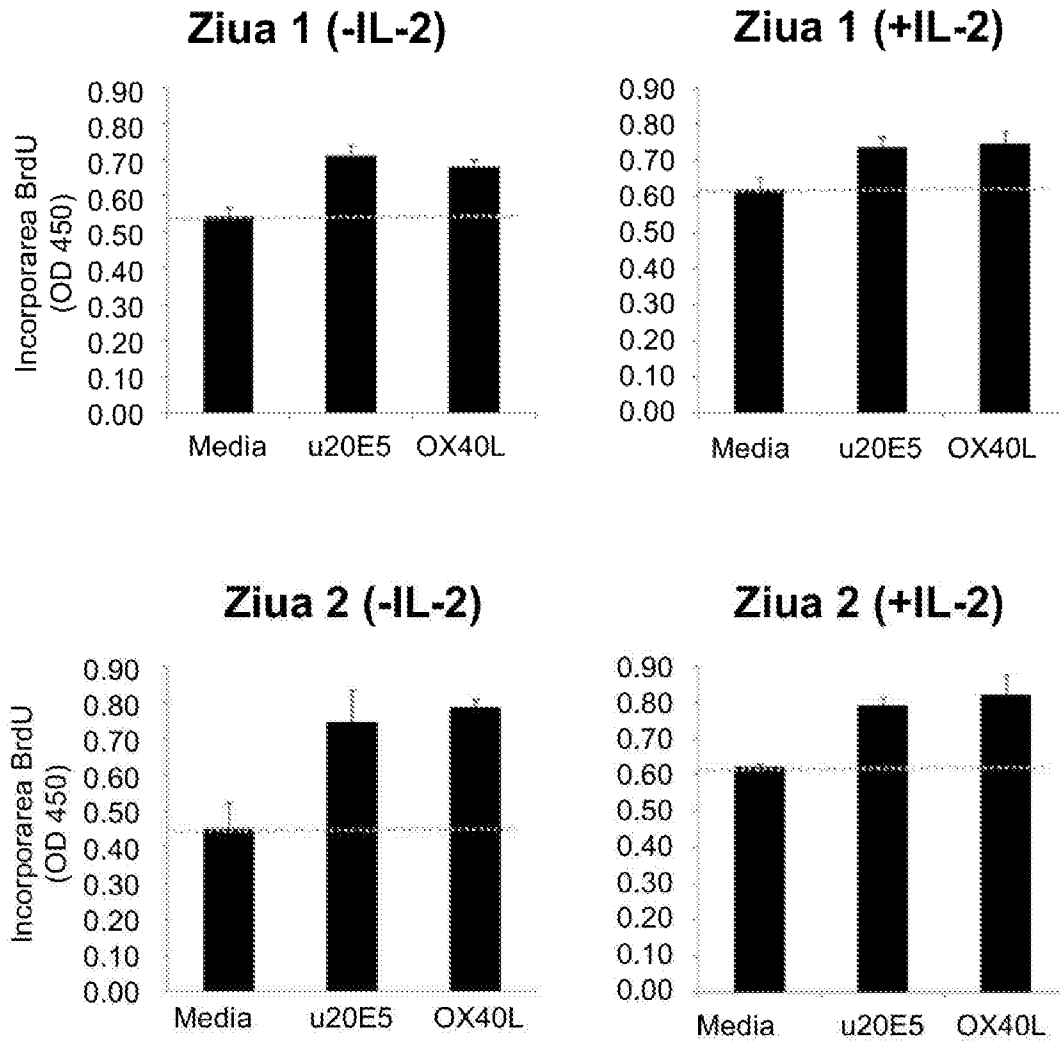


Fig. 18

A

	reducere	încălzire 70 °C
a	-	-
b	-	+
c	+	-
d	+	+

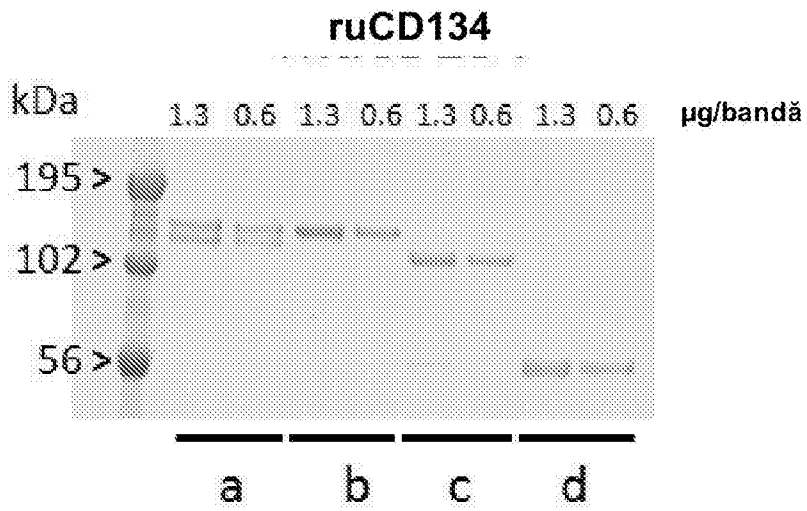
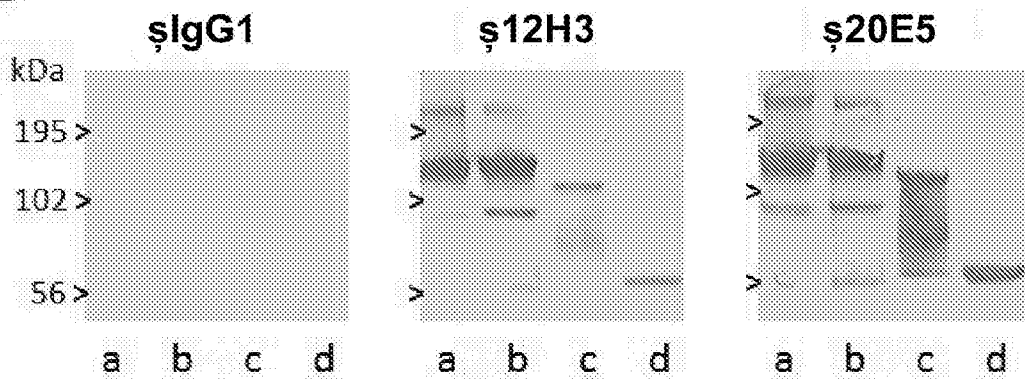
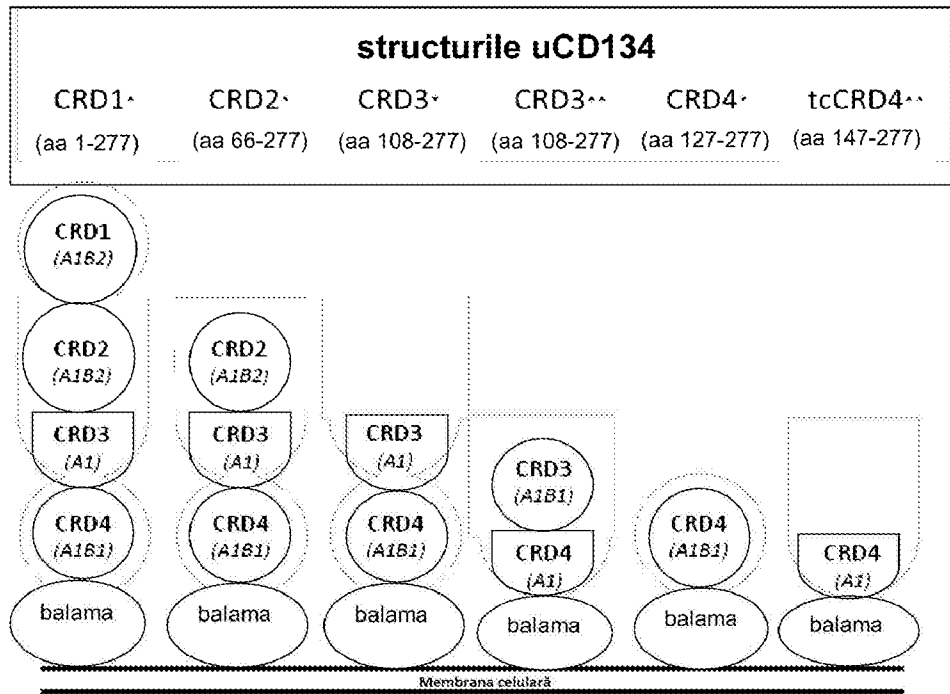
B**C**

Fig. 19

Domeniile extracelulare bogate în cisteină



*Conform Latza *et al.* Eur J. Immunol. 1994

**Conform Compaan *et al.* Structure 2006

Fig. 20

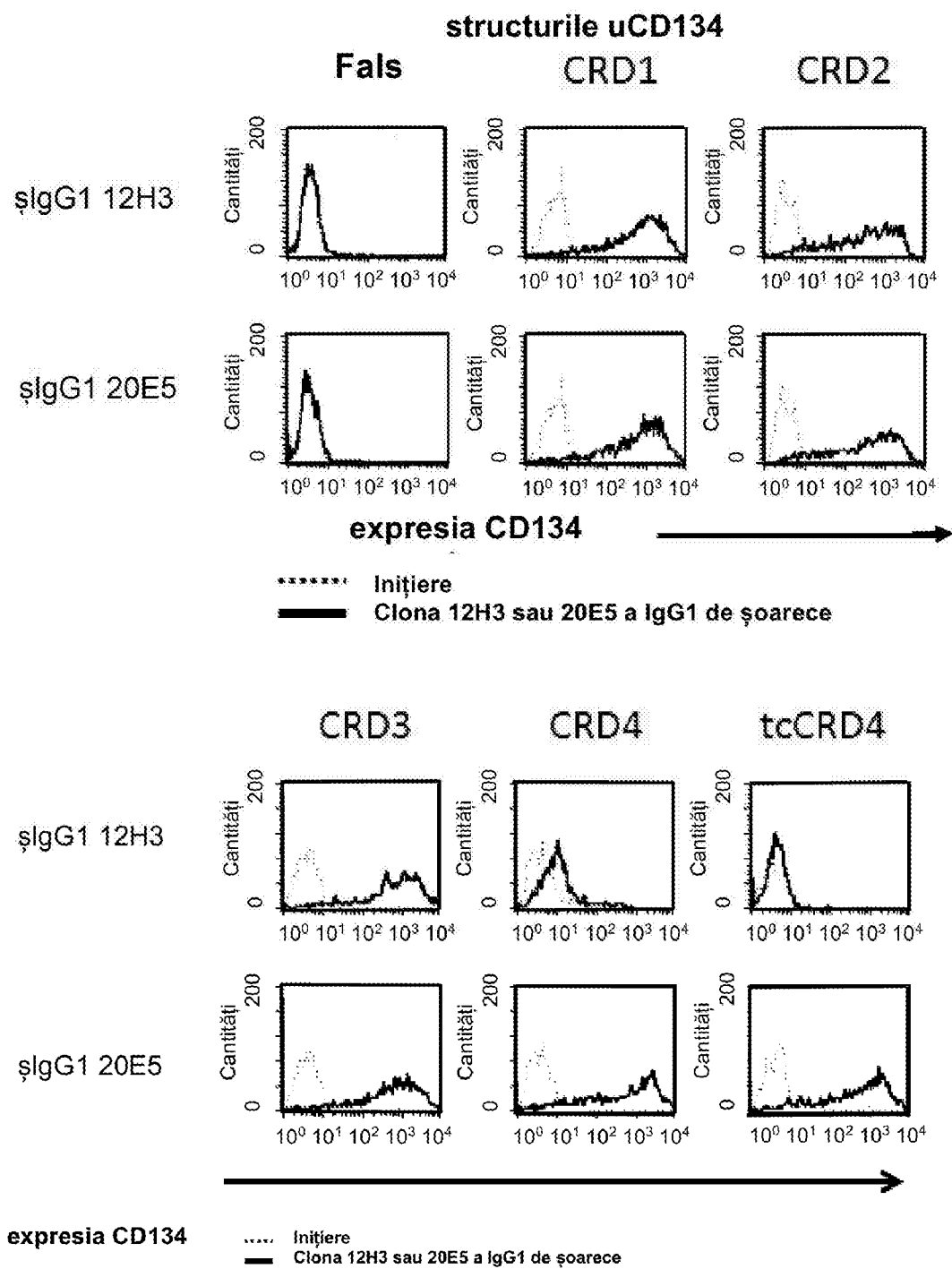


Fig. 21

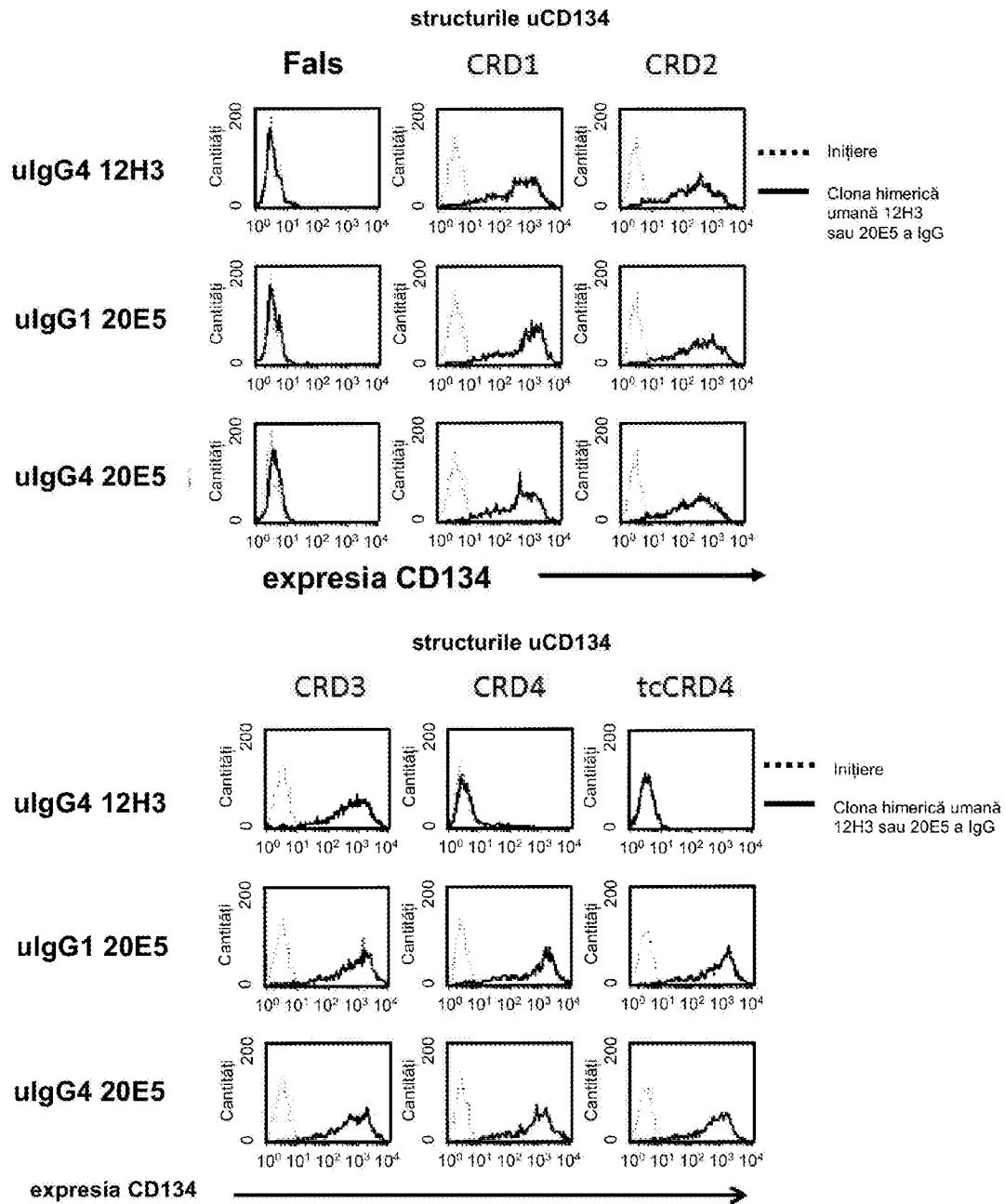


Fig. 22

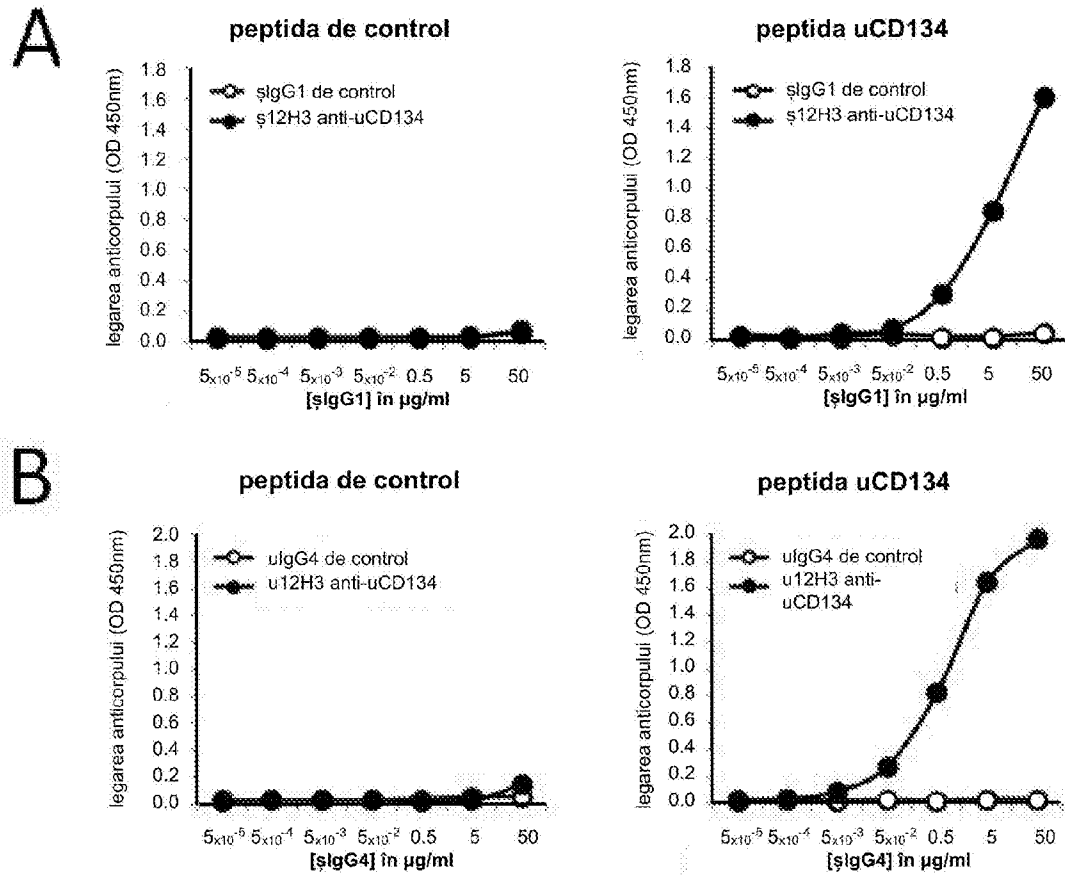


Fig. 23