



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009126723/10, 16.09.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.09.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
17.09.2004 ЕР 04022158.2  
23.12.2004 ЕР 04030546.8(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки, из которой данная заявка выделена: 2007114328  
16.09.2005

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2011 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 10.07.2011 Бюл. № 19

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

Адрес для переписки:

101000, Москва, М.Златоустинский пер., 10,  
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пov.  
Н.В.Кузенковой

## (54) АНТИТЕЛА К OX40L

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой антитела к OX40L, которые содержат Fc-фрагмент, полученный из организма человека, и не связываются с фактором комплемента C1q. Кроме того представлены вектора, клетки, способы

(72) Автор(ы):

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

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

R U 2 4 2 3 3 8 3 C 2

R U 2 4 2 3 3 8 3 C 2

получения антитела, композиции и применения антитела для приготовления лекарственного средства. Антитела обладают новыми и патентоспособными признаками, в частности, преимуществом для пациента, который страдает воспалительными заболеваниями. 17 н. и 2 з.п. ф-лы, 7 табл., 12 ил.

(56) (продолжение):

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

R U      C 2  
2 4 2 3 3 8 3  
2 4 2 3 3 8 3

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU (11) 2 423 383<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/46* (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2009126723/10, 16.09.2005

(24) Effective date for property rights:  
16.09.2005

Priority:

(30) Priority:  
17.09.2004 EP 04022158.2  
23.12.2004 EP 04030546.8

(62) Number and date of filing of the initial application, from which the given application is allocated: 2007114328 16.09.2005

(43) Application published: 20.01.2011 Bull. 2

(45) Date of publication: 10.07.2011 Bull. 19

Mail address:  
101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., 10, kv.15,  
"EVROMARKPAT", pat.pov. N.V.Kuzenkovoj

(72) Inventor(s):  
EhNDL' Jozef (DE),  
JuGI Ehlsi (US),  
FJuNTES Marija (US),  
GRAUS Ivo (NL),  
LABRIJN Aran (NL),  
LANTsENDERFER Martin (DE),  
PARREN Paul (NL),  
REBERS Frank (NL),  
ShUMAKHER Ral'f (DE),  
ZEBER Shtefan (DE),  
VAN-DE-VINKEL Jan (NL),  
VAN-VUGT Martine (NL)

(73) Proprietor(s):  
F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

**(54) OX40L ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and represents OX40L antibodies which contain a Fc-fragment produced from a human body, and do not bind with a complement Clq factor. Besides vectors, cells, methods of producing the antibody, a composition and

applications of the antibody for preparing a drug are presented.

EFFECT: antibodies exhibit new and patentable signs, particularly advantage to a patient which suffers inflammatory diseases.

19 cl, 7 tbl, 23 ex

R U      C 2  
2 4 2 3 3 8 3  
2 4 2 3 3 8 3

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящее изобретение относится в целом к антителам к OX40L и, в частности, к антителам к OX40L, которые не связываются с фактором комплемента C1q, фармацевтическим композициям и их применению.

Предпочтительно эти антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела.

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

25

30

35

40

45

50

Exp. Med. 183, 1996, сс. 2185-2195; Kjaergaard J. и др., J. Immunol. 167, 2001, сс. 6669-6677; Lane P., J. Exp. Med. 19, 2000, сс. 201-206; Mallett S. и Barclay A.N., Immunol. Today 12, 1991, сс. 220-223; Mallett S. и др., EMBO J. 9, 1990, сс. 1063-1068; Ndhlovu L.C. и др., J. Immunol. 167, 2001, сс. 2991-2999; Ohshima Y. и др., J. Immunol. 159, 1997, сс. 3838-3848; Rogers P.R. и др., Immunity 15, 2001, сс. 445-455; Stüber E. и Strober W., J. Exp. Med. 183, 1996, сс. 979-989; Stüber E. и др., Gastroenterology 115, 1998, сс. 1205-1215; Takahashi Y. и др., J. Virol. 75, 2001, сс. 6748-6757; Takasawa N. и др., Jpn. J. Cancer Res. 92, 2001, сс. 377-382; Taylor L. и Schwarz H., J. Immunol. Meth. 255, 2001, сс. 67-72; Weinberg A.D. и др., Nature Medicine 2, 1996, сс. 183-189; Weinberg A.D. и др., Semin. Immunol. 10, 1998, сс. 471-480; Weinberg A.D., Trends Immunol. 23, 2002, сс. 102-109; Wu T. и др., Transplant. Proc. 33, 2001, сс. 217-218; Higgins L.M. и др., J. Immunol. 162, 1999, сс. 486-493; и Yoshioka T. и др., Eur. J. Immunol. 30, 2000, сс. 2815-2823.

Человеческий OX40L представляет собой лиганд человеческого OX40 (CD134), который в течение непродолжительного периода времени экспрессируется на активированных CD4+-T-клетках. Контакт OX40 с его лигандом приводит к возникновению дополнительного стимулирующего (костимулирующего) сигнала Т-клеточной активации. Установлено, что взаимодействие OX40/OX40L создает двунаправленный сигнал (Matsumura Y. и др., J. Immunol. 163, 1999, сс. 3007-3011; Kotani A. и др., Immunol. Lett. 84, 2002, сс. 1-7). Кроме того, взаимодействие OX40/OX40L опосредует адгезию активированной Т-клетки с эндотелиальными клетками в воспалительных тканях. Поскольку для OX40L характерна лишь кратковременная экспрессия на активированных В-клетках, дендритных клетках (DC) и эндотелиальных клетках, антитела к OX40L должны избирательно блокировать Т-клеточную активацию и адгезию эндотелиальных клеток в процессе воспалительного ответа, но не оказывать воздействия на неактивированные периферические Т-клетки. У Yoshioka A. и др. (Eur. J. Immunol. 30, 2000, сс. 2815-2823) продемонстрирован терапевтический потенциал нейтрализующего МАт к мышенному OX40L (mOX40L) при моделировании ревматоидного артрита у мышей. Его введение в очень значительной степени облегчало серьезность заболевания. Установлено, что это антитело обладает аналогичной активностью при использовании моделей других родственных заболеваний, например, воспалительного кожного заболевания,

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

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

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

#### Краткое изложение сущности изобретения

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10           и) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, и вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO:20;

15           или его OX40L-связывающий фрагмент.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 или ее OX40L-связывающий фрагмент.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что человеческая вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную 20 последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 16 и 18.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, 25 что человеческая вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 17, 19 и 20.

Последовательности CDR-участков тяжелой и легкой цепей представлены в 30 SEQ ID NO:21-38 и 39-57.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, 35 что антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO2, 17 или 20.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, 40 что человеческая константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, независимо выбранную из группы, включающей SEQ ID NO:14 и 15, или константная область тяжелой цепи содержит последовательность SEQ ID NO:58.

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

50

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

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

- 5 а) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:58 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,
- 10 б) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:62 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или
- 15 в) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:66 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

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

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

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно отличается тем, что значение  $K_D$ , характеризующей его связывание с OX40L, составляет менее 30  $10^{-8} M$  (от  $10^{-12}$  до  $10^{-8} M$ ), более предпочтительно значение  $K_D$  составляет от  $10^{-12}$  до  $10^{-9} M$  при оценке с помощью BIACore-анализа.

Антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно ингибирует взаимодействие OX40L с OX40 при оценке с помощью ELISA с использованием иммобилизованного OX40L (предпочтительно биотинилированного OX40L, иммобилизованного на сенсибилизированной стрептавидином поверхности) при 40 концентрации сенсибилизирующего агента 0,5 мкг/мл, при этом значение  $IC_{50}$  не превышает 4нМ. Более предпочтительно значение  $IC_{50}$  составляет от 1 до 4нМ.

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

или менее, предпочтительно 20% или менее, по сравнению с B<sub>max</sub> антитела LC.001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Наиболее предпочтительным является антитело, содержащее в качестве

- 20 а) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:59 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:61,
- б) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:63 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:65 или
- в) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:67 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:69.

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

Наиболее предпочтительным является антитело, содержащее в качестве

- 30 а) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:60 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:61,
- б) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:64 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:65 или
- в) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:68 и легкойkapпа-цепи SEQ ID NO:69.

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

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

Таким образом, изобретение относится к антителам к OX40L или индивидуальным тяжелым или легким цепям, которые отличаются их CDR, 45 вариабельными областями, полными аминокислотными последовательностями или гибридомами и которые не содержат никакого Fc-фрагмента или любого типа Fc-фрагмента, предпочтительно Fc-фрагмента человеческого IgG1 или Fc-фрагмента человеческого IgG4, либо немодифицированного, либо

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Подробное описание изобретения

Понятие «OX40L» относится к мембранным белкам типа II, принадлежащему к семейству TNF-лигандов. Его обозначают также как ACT-4-

рецептор, CD134L, gp34 или TNF4\_Human. Он имеет молекулярную массу 34 кДа и хранится в SwissProt под регистрационным номером P23510.

Понятие «OX40» относится к рецептору, который связывается с OX40L. Он относится к мембранным белкам типа I, который принадлежит к семейству TNF-рецепторов. Его обозначают также как ACT-4, OX40L-рецептор, антиген CD134, антиген ACT35, TNFR4\_Human. Он имеет молекулярную массу 50 кДа и хранится в SwissProt под регистрационным номером P43489.

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

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

Понятие «химерное антитело» относится к моноклональному антителу, содержащему вариабельную область, т.е. связывающую область, полученную из одного источника или из одних и тех же видов, и по меньшей мере часть константной области, полученную из другого источника или видов, которое, как правило, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК.

Предпочтительными являются химерные антитела, которые содержат мышью вариабельную область и человеческую константную область. Другими предпочтительными формами «химерных антител», подпадающих под объем настоящего изобретения, являются антитела, константная область которых модифицирована или изменена по сравнению с исходным антителом с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания Fc-рецептора (FcR). Такие химерные антитела обозначают также как «антитела переключенного класса». Химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулинов, содержащих

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

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

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

Понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителам, вариабельные и константные области которых выведены из человеческой зародышей линии последовательностей иммуноглобулина.

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

2555; Jakobovits A. и др., Nature 362, 1993, сс. 255-258; Bruggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, сс. 33-40). Человеческие антитела можно получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom H.R. и Winter, G., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 381-388; Marks J.D. и др., J. Mol. Biol. 222, 1991, сс. 581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно использовать также методы Cole с соавторами и Boerner с соавторами (Cole и др., 10 Моноклональный Антитела and Cancer Therapy, Alan R. Liss, с 77 (1985); и Boerner P., и др., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). Как уже было отмечено для химерных и гуманизированных антител, предлагаемых в изобретении, понятие 15 «человеческое антитело» включает также такие антитела, константная область которых модифицирована с целью получения свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно связывания C1q и/или связывания FcR, например, путем «переключения класса», т.е. замены или мутации Fc- 20 фрагментов (например, IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутация). Изобретение относится также к моно克лональным человеческим антителам к OX40L, которые связываются с C1q и/или FcR. Такие человеческие антитела отличаются высокой избирательностью в отношении человеческого OX40L по сравнению с мышевым OX40L (связывание с мышевым OX40L >30 раз ниже, чем с человеческим OX40L) и не характеризуются неспецифическим связыванием с TNF $\alpha$  или 25 CD40L вплоть до концентрации 500нМ. Такие антитела можно применять для 30 получения антител, которые не связываются с C1q и/или FcR.

Понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего 35 описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, такой как NS0- или 40 CHO- клетка, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным из-за присутствия человеческих генов иммуноглобулинов или антител, экспрессируемых с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектирована клетка-хозяин. Такие рекомбинантные 45 человеческие антитела имеют вариабельную и константную области, которые находятся в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, подвергают соматической гипермутации *in vivo*. 50 Таким образом, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей

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

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

Понятия «гипервариабельный участок» или «антигенсвязывающий центр антитела» в контексте настоящего описания относятся к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывания антигена.

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

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

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

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

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

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

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

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

Антитела, предлагаемые в изобретении, содержат в качестве Fc-фрагмента предпочтительно человеческий Fc-фрагмент и предпочтительно все другие части человеческих константных областей. Fc-фрагмент антитела принимает непосредственное участие в активации комплемента, связывании C1q, активации C3 и связывании Fc-рецептора. Хотя влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q обусловлено определенными сайтами связывания в Fc-фрагменте. Такие сайты связывания известны в данной области и описаны, например, у Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс. 2555-2560; Brunhouse R. и Cebara, J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс. 907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс. 338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс. 995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virol. 75, 2001, сс. 12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс. 319-324; и EP 0307434. Такие сайты связывания представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-индексу, предложенному Кэботом, см. ниже). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обусловливают активацию комплемента, связывание C1q и активацию C3, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента, не связывает C1q и не активирует C3. В контексте настоящего описания понятие «Fc-фрагмент, который имеет человеческое происхождение и не связывает человеческий фактор комплемента C1q и/или человеческий Fc $\gamma$ -рецептор на NK-клетках» обозначает Fc-фрагмент, который представляет собой либо Fc-фрагмент человеческого антитела подкласса IgG4, либо Fc-фрагмент человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2 или IgG3, модифицированный таким образом, что он не связывается с C1q, ни активирует C3 и/или не связывается с FcR, как это будет описано ниже. Понятие

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

Настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с OX40L и не связывается с фактором комплемента C1q и/или Fc-рецептором. В предпочтительном варианте осуществления изобретения эти антитела не обладают комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) и/или антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

Предпочтительно это антитело отличается тем, что оно связывает OX40L, содержит человеческий Fc-фрагмент и не связывает фактор комплемента C1q. Более предпочтительно такое антитело представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело.

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

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

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

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

20          Понятие «комплементзависимая цитотоксичность (CDC)» относится к лизису экспрессирующих OX40L человеческих эндотелиальных клеток 25          антителом, предлагаемым в изобретении, в присутствии комплемента. CDC предпочтительно оценивают путем обработки экспрессирующих OX40L человеческих эндотелиальных клеток антителом, предлагаемым в изобретении, в 30          присутствии комплемента. Клетки предпочтительно метят с помощью кальцеина. Считается, что имеет место CDC, если антитело индуцирует лизис 20% или более клеток-мишеней при его использовании в концентрации 30  
35          мкг/мл. При создании изобретения было обнаружено, что важной является способность антител, предлагаемых в изобретении, снижать связывание с фактором комплемента C1q при анализе с помощью ELISA. В целом, при осуществлении такого анализа планшет для ELISA сенсибилизируют серией 40          концентраций антитела, после чего добавляют очищенный человеческий C1q или человеческую сыворотку. Связывание C1q выявляют с использованием антитела к C1q, а затем с использованием меченного с помощью пероксидазы коньюгата.  
45          Связывание (максимальное связывание B<sub>max</sub>) оценивают по оптической плотности при 405 нм (ОП405) с использованием субстрата для пероксидазы ABTS® (2,2'-азиноди[3-этилбензиазолин-6-сульфонат (6)]. Таким образом, 50          настоящее изобретение относится к антителу, отличающемуся тем, что оно

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

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

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

5 эфекторными клетками и анализируют высвобождение в супернатант  $^{51}\text{Cr}$ . Для получения контролей инкубируют эндотелиальные клетки-мишени с  
 10 эфекторными клетками без антитела. Способность антител индуцировать начальные стадии, обусловливающие ADCC, оценивают путем анализа связывания с экспрессирующими Fc $\gamma$ -рецептор клетками, такими как клетки, в которых в результате рекомбинации происходит экспрессия Fc $\gamma$ RI и/или Fc $\gamma$ RIIA, или NK-клетки (экспрессирующие в основном Fc $\gamma$ RIIIA).  
 Предпочтительно оценивают связывание с Fc $\gamma$ R на NK-клетках.

15 Эффекторные функции, связанные со связыванием Fc-рецептора, могут быть опосредованы взаимодействием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецепторами (FcR), которые представляют собой специализированные рецепторы клеточной поверхности на гематопоэтических клетках. Fc-рецепторы принадлежат к 20 суперсемейству имmunоглобулинов, и для них установлена способность опосредовать как удаление покрытых антителом патогенов путем фагоцитоза иммунных комплексов, так и лизис эритроцитов и различных других клеточных мишней (например, опухолевых клеток), покрытых соответствующим 25 антителом, посредством антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC) (Van de Winkel J.G. и Anderson C.L., J. Leukoc. Biol. 49, 1991, сс. 511-524). FcR определяют по их специфичности в отношении 30 изотипов иммуноглобулинов; Fc-рецепторы, специфичные для антител типа IgG, обозначают как Fc $\gamma$ R, для IgE как Fc $\epsilon$ R, для IgA как Fc $\alpha$ R и т.д. Связывание Fc-рецептора описано, например, у Ravetch J.V. и Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9, 35 1991, сс. 457-492; Capel P.J. и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34; de Haas M. и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, сс. 330-341; и Gessner J.E. и др., Ann. Hematol. 76, 1998, сс. 231-248.

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

50 - Fc $\gamma$ RI (CD64), который связывается с мономерным IgG с высокой аффинностью и экспрессируется на макрофагах, моноцитах, нейтрофилах и

эозинофилах. Модификация IgG, включающая по меньшей мере одну из следующих мутаций E233-G236, P238, D265, N297, A327 и P329, снижает связывание с Fc $\gamma$ RI. Остатки IgG2 в положениях 233–236, замещенные в IgG1 и IgG4, снижали связывание с Fc $\gamma$ RI в 10<sup>3</sup> раз и элиминировали способность человеческих моноцитов реагировать на сенсибилизированные антителом эритроциты (Armour K.L. и др.. Eur. J. Immunol. 29, 1999, сс. 2613–2624).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

III) путем блокирования антителом, что установлено на клеточном уровне с помощью FACS-анализа, в котором взаимодействия K562-клеток, экспрессирующих OX40L (K562\_OX40L) в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/образце, с OX40, при этом значения IC<sub>50</sub> составляют от 4 до 20нМ,

IV) путем блокирования антителом трансдукции сигнала OX40, индуцируемого K562\_OX40L, что установлено при анализе трансдукции индуцируемого OX40 сигнала с использованием  $3 \times 10^4$  HeLa-клеток, экспрессирующих OX40 на образец, что приводит к блокаде NFκB-активации, при этом значения IC<sub>50</sub> составляют от 1 до 5нМ,

V) путем блокирования антителом индуцируемой OX40L Т-клеточной активации, что установлено с помощью анализа Т-клеточной активации при использовании K562\_OX40L в концентрации  $1,5 \times 10^5$  клеток/образец и ФГА (фитогемагглютинин) в концентрации 0,75 мкг/мл, при этом значения IC<sub>50</sub> составляют от 1 до 10нМ, и/или

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45      Предпочтительными являются также все комбинации каждой из вариабельных областей антител, представленные в подпунктах а) – и), в сочетании с гамма-цепью, представленной в подпункте л), м), н) или п), и

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5        В изобретении предложен способ модификации начальной аминокислотной последовательности CDR тяжелой цепи родительского антитела, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:21-38, и/или CDR легкой цепи антитела, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO:39-57, отличающийся тем, что, 10 получают нуклеиновую кислоту, которая кодирует начальную аминокислотную последовательность, модифицируют нуклеиновую кислоту так, чтобы модифицировать одну аминокислоту в CDR1 тяжелой цепи, модифицировать 1-2 аминокислоты в CDR2 тяжелой цепи, модифицировать 1-2 аминокислоты в CDR3 тяжелой цепи, модифицировать 1-3 аминокислоты в CDR1 легкой цепи, модифицировать 1-3 аминокислоты в CDR2 легкой цепи и/или модифицировать 20 1-3 аминокислоты в CDR3 легкой цепи, экспрессируют модифицированную аминокислотную последовательность CDR в структуре антитела, оценивают способность антитела связываться с OX40L, так чтобы значение  $K_D$  составляло менее  $10^{-8} M$ , и отбирают модифицированный CDR, если связывание антитела с OX40L характеризуется значением  $K_D$  ниже  $10^{-8} M$ . Предпочтительно такие 25 модификации представляют собой консервативные модификации последовательности.

30        Идентичность или гомологию последовательности в контексте настоящего описания определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (рассматриваемой последовательности), 35 идентичных остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Нельзя 40 конструировать никакие N-концевые, С-концевые или внутренние удлинения, делеции или инсерции в последовательности антитела, которые влияют на идентичность или гомологию последовательностей. Вариант сохраняет способность связываться с человеческим OX40L и предпочтительно обладает 45 свойствами, превышающими свойства родительского антитела. Например, может оказывать меньшее побочное действие при лечении ревматоидного артрита и астмы, поскольку OX40L не только кратковременно экспрессируется на В-клетках, дендритных клетках и макрофагах, но также и на эндотелиальных

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

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

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

(например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Так, предварительно выбранный (предсказанный) заменимый аминокислотный остаток в человеческом антителе к OX40L можно предпочтительно заменять другой аминокислотный остаток из семейства с такими же боковыми цепями.

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

Изобретение относится также к способу получения антитела, отличающемуся тем, что последовательность первой нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, связывающегося с OX40L, где связывание характеризуется значением KD ниже  $10^{-8}$  М, модифицируют таким образом, чтобы модифицированное антитело не связывалось с фактором комплемента С1q и/или человеческим Fc $\gamma$ -рецептором на NK-клетках, указанную модифицированную первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, которая кодирует легкую цепь антитела, встраивают в экспрессионный вектор, вектор встраивают в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, культивируют клетку-хозяина в условиях, позволяющих синтезировать антитело, и выделяют антитело из культуры.

Изобретение относится также к способу получения антитела, предлагаемого в изобретении и содержащего человеческий Fc-фрагмент, который заключается в том, что а) трансформируют клетку-хозяина нуклеотидной последовательностью, которая кодирует легкую цепь родительского человеческого антитела, предлагаемого в изобретении, и второй последовательностью ДНК, которая кодирует тяжелую цепь родительского человеческого антитела, Fc-фрагмент которого модифицирован так, что Fc-фрагмент не связывается с фактором комплемента С1q и/или Fc-рецептором; б) экспрессируют первую и вторую последовательность ДНК с получением тяжелых и легких цепей антитела и в) выделяют антитело из клетки-хозяина или культуры клетки-хозяина.

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

5           этих векторов. Изобретение относится к способу получения антител, заключающемуся в том, что культивируют соответствующие клетки-хозяева в условиях, которые позволяют синтезировать молекулы антитела, и выделяют антитела из культуры, например, путем экспрессии нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь, и нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь, в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине, и 10           выделения полипептида из клетки.

15           Под объем изобретения подпадает диагностическое и терапевтическое применение антитела. Касательно одного из вариантов диагностического применения изобретение относится к способу выявления присутствия белка OX40L, заключающемуся в том, что обрабатывают образец, для которого ожидается, что он содержит OX40L, антителом к OX40L и определяют связывание антитела с образцом. Белок OX40L можно встраивать в клеточную 20           мембрану экспрессирующих OX40L клеток в виде их трансмембранныго домена, или он может присутствовать в виде растворимого внеклеточного домена в общей воде организма, высвобождаясь с помощью механизмов типа 25           просачивания или протеолитического высвобождения. Для такого применения в изобретении предложен набор, содержащий антитело и инструкции по применению антитела для обнаружения белка OX40L.

30           Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для предупреждения и/или лечения воспалительных заболеваний у млекопитающего, 35           предпочтительно у пациента, у которого предполагается возникновение такого заболевания или который страдает им. Такие заболевания представляют собой аллергические реакции, такие как астма. Другие варианты применения включают лечение аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

40           Изобретение относится также к способу лечения млекопитающего, 45           страдающего вышеуказанными воспалительными заболеваниями, прежде всего астмой и ревматоидным артритом.

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

образом серьезной персистентной астмой. Антилого можно предпочтительно вводить подкожно один или два раза в месяц. Основным критерием 5 предпочтительно является снижение острых обострений заболевания. Другие критерии включают максимальное количество выделяющейся жидкости, проявление симптомов астмы в дневное время,очные пробуждения, качество жизни, посещения кабинета неотложной помощи, количество дней, в которые не 10 проявляются симптомы астмы, применение агониста beta-2, снижение или сужение спектра стероидов и воздействие на гипер-реактивность.

Предпочтительным является также применение антител, предлагаемых в 15 изобретении, для монотерапии или в сочетании с метотрексатом или другими DMARD (модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства) для лечения взрослых людей, страдающих активным ревматоидным 20 артритом от средней до серьезной степени тяжести. Их можно вводить в виде подкожной инъекции каждые 2 или 4 недели. Их можно применять для длительного лечения пациентов, для которых не обладают эффективностью одно 25 или несколько DMARD. Критерии должны включать снижение признаков и симптомов и ингибирование развития структурного повреждения у взрослых пациентов, страдающих активным ревматоидным артритом. Предупреждение нетрудоспособности, улучшение признаков и симптомов, оценивают на основе 30 ACR-критерия (ACR20 >60%, ACR50 > 35%, ACR70 > 15%; индекс, предложенный Американским коллежем ревматологии (American College of Rheumatology); [www.rheumatology.com](http://www.rheumatology.com)).

Еще одним вариантом осуществления изобретения является применение 35 антилого, предлагаемых в изобретении, для приготовления лекарственных средств, предназначенных для лечения указанных заболеваний.

Изобретение относится также к применению указанных выше антилого для 40 приготовления фармацевтической композиции, в частности фармацевтической композиции, содержащей антилого, предлагаемое в изобретении, в фармацевтически эффективном количестве, необязательно в сочетании с 45 буфером и/или адьювантом, который можно применять для получения препартивной формы антилого для фармацевтических целей.

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, 50 содержащим указанные антилого в фармацевтически приемлемом носителе. В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Варианты аминокислотной последовательности (или мутанты) человеческого антитела к OX40L получают путем интродукции соответствующих нуклеотидных замен в ДНК антитела или путем синтеза 10 нуклеотидов. Однако такие модификации можно осуществлять только в очень ограниченном диапазоне, например, как описано выше. Например, модификации не должны изменять вышеуказанные характеристики антитела, такие как изотип IgG и связывание с эпитопом, но могут повышать выход продукта 15 рекомбинации, стабильность белка или облегчать очистку.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддерживании 20 соответствующей конформации антитела к OX40L, можно также заменять, как правило, на серин, для повышения стабильности при окислении молекулы и предупреждения аномального перекрестного сшивания. И наоборот, 25 цистеиновую(ые) связь(и) можно добавлять в антитело для повышения его стабильности (прежде всего, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Молекулы нукleinовых кислот, которые кодируют варианты 30 аминокислотных последовательностей антител к OX40L, получают с помощью различных известных в данной области методов. Эти методы включают (но, не ограничиваясь ими) выделение из естественного источника (в случае 35 встречающихся в естественных условиях вариантов аминокислотных последовательностей) или получение путем опосредуемого олигонуклеотидом (или сайтнаправленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или невариантной версии гуманизированного 40 антитела к OX40L.

Изобретение относится также к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, предлагаемое в изобретении, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, токсин, (например, обладающий 45 ферментативной активностью токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты), радиоактивный изотоп (т.е., радиоконъюгат). Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с 50 использованием широкого разнообразия бифункциональных связывающих белки

агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидал<sup>5</sup>хHCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидопроизводные (такие как бис(*пара*-азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис(*пара*-<sup>10</sup>диазониумбензоил)этилендиатнин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат), и обладающие двойной активностью фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин <sup>15</sup> можно получать согласно методу, описанному у Vitetta E.S. и др., Science 238, 1987, сс. 1098-1104). Меченная с помощью С<sup>14</sup> 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером <sup>20</sup> хелатирующего агента, применяемого для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026).

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

<sup>30</sup> Другим объектом изобретения являются В-клетки, выделенные из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, в которой экспрессируются человеческие антитела к OX40L (например, родительские антитела, которые продуцируются клеточной линией, выбранной из группы, включающей клетки гибридом, которые продуцируют антитела, предлагаемые в изобретении). Предпочтительно выделенные В-клетки получают из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, которую иммунизировали очищенной рекомбинантной формой антигена OX40L и/или клетками, экспрессирующими OX40L. Предпочтительно трансгенное <sup>35</sup> животное кроме человека, например, трансгенная мышь, имеет геном, который содержит трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, которые кодируют все антитело, предлагаемое в изобретении, или его часть. Выделенные В-клетки затем иммортализуют для создания источника <sup>40</sup> (например, гибридомы) человеческих антител к OX40L. Таким образом, <sup>45</sup> <sup>50</sup>

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

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

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

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

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

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

растворимого антигена OX40L (например, очищенного из экспрессирующих OX40L клеток), сшитый с KLH или в ЗФР. Для усиления иммунных ответов можно осуществлять объединенную альтернативную иммунизацию выделенным белком OX40L и клетками, экспрессирующими OX40L, например, линией опухолевых клеток. С помощью кумулятивного опыта с использованием различных антигенов установлено, что трансгенные HuMAb-мыши дают наиболее хороший ответ, когда осуществляют начальную внутрибрюшинную иммунизацию (i.p.) с использованием антигена в полном адьюванте Фрейнда с последующими i.p.-иммунизациями каждую вторую неделю (например, в целом вплоть до шести) антигеном в неполном адьюванте Фрейнда. Иммунный ответ можно оценивать в процессе протокола иммунизации с использованием образцов плазмы, получаемых из ретроорбитального сплетения. Плазму можно анализировать с помощью ELISA, и мышей, у которых обнаружены достаточные по уровню титры человеческого иммуноглобулина к OX40L, можно использовать для создания иммортализованной линии соответствующих В-клеток. Мышей можно подвергать бустер-инъекциям антигеном внутривенно за 3-4 дня до умерщвления и удалять у них селезенку и лимфатические узлы. Каждым антигеном можно иммунизировать несколько мышей. Например, можно иммунизировать всего 12 HuMAb-мышей линий HCo7 и HCo12.

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

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

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

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

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

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

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для диагностики OX40L *in vitro*, предпочтительно с помощью иммунологического анализа, позволяющего определять связывание между OX40L (либо растворимым, либо связанным с мембраной) образца и антителом, предлагаемым в изобретении.

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

50

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

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

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

50

Фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители представляют собой стерильные водные растворы или стерильные порошки для получения не изготовленных заранее стерильных инъецируемых растворов или дисперсии.

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

Фразы «парентеральное введение и «введение парентеральным путем» в 10 контексте настоящего описания относятся к путям введения, отличным от энтерального и местного применения, как правило, с помощью инъекции, и включают (но, не ограничиваясь ими) внутривенную, внутримышечную, 15 внутриартериальную, внутриоболочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, 20 подкапсульную, подпаутинную, интраспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических 25 композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, могут варьироваться так, чтобы получать количество действующего вещества, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при использовании композиции и пути введения, которые не являются токсичными для пациента.

30 Выбранный уровень доз может зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций, применяемых согласно настоящему изобретению, или их сложных эфиров, солей или амидов, пути введения, времени введения, скорости экскреции конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения или других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными 35 указанными композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни пациента, подлежащего лечению, и других подобных факторов, которые хорошо известны в данной области. Как правило, недельная доза может составлять от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг 40 или более, в зависимости от указанных выше факторов.

Следующие примеры, ссылки, перечень последовательностей даны с целью 45 лучшего понимания настоящего изобретения, полный объем которого представлен в приведенной ниже формуле изобретения. Очевидно, что могут

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

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

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

на фиг. 1б – данные, полученные с помощью «блокирующего ELISA» + данные о значения IC<sub>50</sub>, для TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033;

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

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

на фиг. 4 и 5 – данные, полученные с помощью «анализа Т-клеточной активации», и данные о значениях IC<sub>50</sub> для TAG-34, LC.001 и LC.005 (фиг. 4 - высвобождение IL-2, фиг. 5 - ингибиование);

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

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

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

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

на фиг. 10 - данные о способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с FcγRI (n=4), FcγRIIa (n=4) и FcγRIIb (n=4);

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

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

Описание перечня последовательностей

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

SEQ ID NO:61 легкая каппа-цепь LC.001

SEQ ID NO:62 тяжелая  $\gamma$ -цепь LC.005 (человеческий IgG1-типа)

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

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

SEQ ID NO:65 легкая каппа-цепь LC.005

SEQ ID NO:66 тяжелая  $\gamma$ -цепь LC.060 (человеческий IgG1-типа)

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

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

SEQ ID NO:69 легкая каппа-цепь LC.060

Сокращения:

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

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

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

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

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

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

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

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

IgG4 $\times$  означает мутацию S228P в IgG4.

LC2010-001 является синонимом LC.001

Fcg является синонимом Fc $\gamma$ (Fc $\gamma$ )

Аналогично обозначены другие замены в последовательностях антител.

	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40L, слитый с гистидиновой меткой	hOX40L-His
5	Рекомбинантный растворимый мышиный OX40L, слитый с гистидиновой меткой	mOX40L-His
	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40L, слитый с Flag-меткой	hOX40L-Flag
	Рекомбинантный растворимый мышиный OX40L, слитый с Flag-меткой	mOX40L-Flag
10	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40, слитый с человеческим Fc $\gamma$	hOX40 -hFc
	Кроличье моноклональное антитело к мышенному Fc $\gamma$	анти-mFc
	Козье моноклональное антитело к человеческому Fc $\gamma$	анти-hFc
	Мышиное моноклональное антитело к гистидину	анти-His
15	Рекомбинантный растворимый человеческий OX40, слитый с мышним Fc $\gamma$	hOX40 -mFc
	Мышиное моноклональное антитело к TNF $\alpha$	анти-TNF $\alpha$
	Мышиное моноклональное антитело к CD40L	анти-CD40L
	Фактор некроза опухоли альфа	TNF $\alpha$
20	CD40-лиганд	CD40L
	Крысиное моноклональное антитело к человеческому OX40L	TAG34
	Человеческие моноклональные антитела к человеческому OX40L	LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060, LC.063
25	фитогемагглютинин	ФГА

30

ПримерыПример 1Получение клеточной линии гибридомы, продуцирующей антитела к

35

**OX40L**Культура гибридом

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

Процедура иммунизации трансгенных мышей

LC2010-001: Шесть НСо7-мышей (2 самца и 4 самки), линия GG2201 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) и четыре НСо12-мышей (4

самца), штамм GG2198 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) подвергали альтернативной иммунизации с использованием  $1 \times 10^6$  клеток линии HEK293, кратковременно трансфектированных экспрессионным вектором, несущим человеческий OX40L (hOX40L), и 20 мкг растворимого внеклеточного домена hOX40L. Осуществляли всего 8 иммунизаций, 4 внутрибрюшинные (i.p.) иммунизации с использованием клеток, экспрессирующих hOX40L, и 4 под кожные (s.c.) иммунизации в область хвоста с использованием рекомбинантного белка. Для первой иммунизации 100 мкл  $1 \times 10^6$  HEK293-hOX40L-клеток смешивали с 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA; фирма Difco Laboratories, Детройт, США). Для всех других иммунизаций использовали 100 мкл клеток в ЗФР или смешивали рекомбинантный белок с 100 мкл неполного адьюванта Фрейнда (ICFA; фирма Difco).

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

LC2010-001, LC.059, LC.060 и LC.063 получали из НСо12-мышей.

LC2010-005, -010, -019, -029 и -033: Пять НСо7-мышей (4 самца и 1 самка) линии GG2201 (фирма Medarex, Сан-Хосе, шт. Калифорния, США) иммунизировали с использованием 20 мкг растворимого внеклеточного домена hOX40L. Осуществляли всего 7 иммунизаций, 4 внутрибрюшинных (i.p.) и 3 под кожные (s.c.) иммунизации в область хвоста. Для первой иммунизации 100 мкл рекомбинантного белка смешивали с 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (CFA; фирма Difco Laboratories, Детройт, США). Для всех других иммунизаций 100 мкл рекомбинантного белка смешивали с 100 мкл неполного адьюванта Фрейнда (ICFA; фирма Difco).

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

#### Создание гибридом

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

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

Специфический для антигена ELISA

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

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

ELISA для каппа-цепи

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

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

### Пример 2

#### Клонирование и анализ последовательностей вариабельных областей

#### НуМАт к OX40L

##### (Легкая каппа-цепь и тяжелая γ1-цепь)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельную область легкой цепи V<sub>L</sub> и вариабельную область тяжелой цепи V<sub>H</sub> НуМАт к OX40L выделяли с помощью стандартных методов синтеза кДНК/ПЦР.

Общую РНК получали из 1×10<sup>6</sup> – 1×10<sup>7</sup> клеток гибридомы с помощью набора GeneRacer<sup>TM</sup> (фирма Invitrogen). Полученную из гибридомы РНК применяли в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК и лигировали с олиго-dT-праймером GeneRacer<sup>TM</sup>. Синтез второй цепи кДНК и дальнейшую ПЦР-амплификацию кодирующих V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> кДНК-фрагментов осуществляли с использованием обратных праймеров легкой и тяжелой цепи, комплементарных нуклеотидным последовательностям легкой каппа-цепи и константной области тяжелой γ1-цепи, и 5'-специфических праймеров GeneRacer<sup>TM</sup> соответственно. ПЦР-продукты клонировали с помощью набора для клонирования TOPO<sup>TM</sup> TA фирмы Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies и pCR4-TOPO<sup>TM</sup> в качестве клонирующего вектора. Клонированные ПЦР-продукты идентифицировали путем рестрикционного картирования соответствующих плазмид с использованием

расщепления с помощью EcoRI и на основе ожидаемых/рассчитанных данных о размерах ДНК-фрагментов, составляющих примерно 740 и 790 пар оснований для V<sub>L</sub> и V<sub>H</sub> соответственно.

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

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

### Пример 3

#### Конструирование экспрессионных плазмид для HuМАт к OX40L IgG1-изотипа

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

При этом сегменты генов, кодирующих вариабельную область легкой цепи (V<sub>L</sub>) HuМАт к OX40L и константную область человеческой легкой каппа-цепи (C<sub>L</sub>, SEQ ID NO:13 или выбранная из SEQ ID NO: 61, 65 или 69), соединяли с сегментами генов, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) HuМАт к OX40L и константную область человеческой тяжелой γ1-цепи (C<sub>H1</sub>-шарнир-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>, SEQ ID NO:14, или выбранная из SEQ ID NO:58, 62 или 66).

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

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

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

- сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, включающая инtron сигнальной последовательности,
- 5 - клонированная кДНК вариабельной области легкой цепи НиМАт к OX40L, содержащая уникальный сайт рестрикции BsmI на 5'-конце и сайт донора сплайсинга и уникальный сайт рестрикции NotI на 3'-конце,
- 10 - человеческий ген константной области каппа-цепи, включающий инtron 2 мышного энхансера Ig-каппа [Picard D. и Schaffner W., Nature 307, 1984, сс. 80-82], и
- 15 - сигнальная последовательность полиаденилирования («поли-А») каппа-цепи человеческого иммуноглобулина.

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

- 20 - немедленно-ранний энхансер и промотор из человеческого цитомегаловируса (HCMV),
- синтетический 5'-УТ, включающий последовательность Козака,
- 25 - модифицированная сигнальная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, включающая инtron сигнальной последовательности,
- клонированная кДНК вариабельной области тяжелой цепи НиМАт к OX40L, содержащая уникальный сайт рестрикции BsmI на 5'-конце и сайт донора сплайсинга и уникальный сайт рестрикции NotI на 3'-конце,
- 30 - человеческий ген константной области тяжелой  $\gamma 1$ -цепи, включающий  $\mu$ -энхансер мышного Ig (Neuberger M.S., EMBO J. 2, 1983, сс. 1373-1378),
- 35 - сигнальная последовательность полиаденилирования («поли-А»)  $\gamma 1$ -цепи человеческого иммуноглобулина.

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

- 40 ген, обуславливающий устойчивость к гигромицину,
- сайт инициации репликации, oriP, вируса Эпштейна-Барра (EBV),
- 45 сайт инициации репликации из вектора pUC18, обеспечивающий репликацию этой плазмиды в *E. coli*, и
- ген  $\beta$ -лактамазы, который придает устойчивость *E. coli* к ампициллину.

#### Пример 4

Конструирование экспрессионных плазмид для HuMAT к OX40L IgG4-изотипа

5 Прототип экспрессионной плазмиды тяжелой  $\gamma$ 4-цепи антитела к OX40L получали из экспрессионной плазмиды тяжелой  $\gamma$ 1-цепи антитела к OX40L, заменяя константную область  $\gamma$ 1-цепи и сигнальную последовательность 10 полиаденилирования («поли А»)  $\gamma$ 1-иммуноглобулина из человеческого генома на константную область  $\gamma$ 4-цепи из человеческого генома (SEQ ID NO:15 или 15 последовательность, выбранная из последовательностей немутантных константных областей  $\gamma$ 4-цепи, представленных в SEQ ID NO:60, 64 или 68) и сигнальную последовательность полиаденилирования  $\gamma$ 4-иммуноглобулина.

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

20 Пример 5

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

25 Экспрессионные плазмиды, кодирующие мутантные тяжелые  $\gamma$ 1- и  $\gamma$ 4-цепи антитела к OX40L, создавали путем сайтнаправленного мутагенеза экспрессионных плазмид дикого типа с использованием набора для сайтнаправленного мутагенеза типа QuickChange<sup>TM</sup> (фирма Stratagene). 30 Нумерация аминокислот соответствует EU-нумерации (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, cc. 78-85; Kabat E.A., и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991)). 35

Таблица 1

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

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

Пример 6Получение рекомбинантных HuМАт к OX40L

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

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

Пример 7

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

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

Таблица 2

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

Не обнаружено взаимодействие TAG34 с mOX40L.

#### Оценка данных и обобщение данных всех Biacore-анализов

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

#### Пример 8

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

Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Перед инъекцией 5 аналит (10нМ) и конкурент (8 концентраций от 0,78 до 100нМ) предварительно инкубировали в течение по меньшей мере 20 мин при 22°C. Инъекцию аналита +/- конкурента осуществляли в течение 3 мин и промывали HBS-P в течение 3 10 мин. Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует 15 приведенной ниже в таблице 3.

Таблица 3

Чип	Лиганд	Аналит	Конкурент	$IC_{50}$ (M)
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	TAG34	$7 \times 10^{-9}$
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.001	$4 \times 10^{-9}$
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.005	$3 \times 10^{-9}$

25 Все антитела ингибировали связывание OX40L с OX40 в растворе аффинность в растворе). Для LC.001 и LC.005 обнаружены более низкие 20 значения  $IC_{50}$ , чем для TAG34.

### Пример 9

Характеристика эпитопов антител к OX40L TAG34, LC.001, LC.005, 30 LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.060

35 Оборудование: Biacore 3000, буфер для погона и реакционный буфер: HBS-P (10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 0,005% Твин 20, pH 7,4), 25°C. Группы эпитопов определяли путем оценки перекрестной конкуренции перечисленных антител. 40 Перед инъекцией аналит (50нМ) и конкурент (100нМ) предварительно инкубировали по меньшей мере в течение 20 мин при 22°C. Инъекцию аналита +/- конкурента осуществляли в течение 2 мин и промывали HBS-P в течение 3 мин. Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мМ 45 глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует приведенной ниже в таблице 4.

50

Таблица 4

Чип	Иммобилизующее антитело	Лиганд	Аналит	Конкурент	Эпитоп
5	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	TAG34 A
	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.001 A
10	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.005 B
	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.010 B
15	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.019 A/B
	CM5	анти-hFcг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.029 B
20	CM5	анти-hFCг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.033 A
	CM5	анти-hFCг	анти-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.060 A

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

Однако TAG34 не связывается с денатурированным OX40L (при анализе 25 методом Вестерн-блоттинга) при концентрации антитела 100 нг. Для антител, распознающих одну группу эпитопов (А или В), обнаружена перекрестная ингибирующая активность, в то время как для антител из различных групп 30 обнаружены сигналы, свидетельствующие об аддитивном связывании. LC.019 нейтрализует другие антитела из группы А, а также из группы В.

#### Пример 10

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

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

Регенерацию поверхности осуществляли с помощью двух инъекций 10мM 40 глицином, pH 2,0 по 1 мин каждая. Информация о типе чипа, формате анализа и инъецируемых последовательностях и кинетических данных соответствует 45 приведенной ниже в таблице 5.

Таблица 5

Чип	Иммобилизующее антитело	Лиганд	Аналит
CM5	анти-mFcг анти-hFcг	TAG34 LC.001 LC.005 анти-TNFα анти-CD40L	TNFα CD40L OX40L

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

#### Пример 11

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

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

Таблица 6

Чип	Иммобилизующее антитело	Лиганд	Аналит	ka (1/Mс)	kd (1/c)	K <sub>D</sub> (M)
CM5	анти-mFcг	LC.001	hOX40 L-His	$4,27 \times 10^4$	$3,46 \times 10^{-8}$	$<2,3 \times 10^{-11}$
CM5	анти-mFcг	LC.001-IgG4x	hOX40 L-His	$4,85 \times 10^4$	$7,72 \times 10^{-8}$	$<2,06 \times 10^{-11}$

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

Пример 12ELISA для обнаружения связывания антител с OX40L

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

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

Пример 13ELISA для обнаружения ингибирования антителами взаимодействия человеческий OX40/ человеческий OX40L

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

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

инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали дважды, используя ОБ. Конъюгат овечье антитело<дигоксигенин>-POD (фирма Roche) разводили до 50 мед./мл в ИБ и добавляли в лунки. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. И, наконец, планшеты отмывали дважды, используя ОБ, и планшеты оценивали в присутствии готового к применению раствора ABTS® (фирма Roche) при комнатной температуре (КТ) в темноте. Абсорбцию оценивали при 405 нм через 1-20 мин (фиг. 1б). Было установлено, что значения IC<sub>50</sub> составляют от 1 до 4 нМ.

#### Пример 14

FACS-анализ для выявления HuMAt, ингибирующих взаимодействие человеческого OX40 с человеческим OX40L, экспрессируемым на K562-клетках (K562\_OX40L-клетки)

Цель: Анализ для выявления способности HuMAt к hOX40L блокировать взаимодействие меченного с помощью Dig слитого белка hOX40:hFc с экспрессирующей hOX40L клеточной линии K562\_hOX40L.

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

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

$2 \times 10^5$  клеток K562\_OX40L (выращенных в ISF-0) отмывали в 2 мл ЗФР и ресуспендировали в 100 мкл ЗФР. После этого добавляли конкурент в ЗФР (конкурент/реагент в соотношении 0:1 / 1:1 / 1.5:1 / 2:1 / 2.5:2 / 5:1). Затем инкубировали в течение 30 мин, при КТ и при дневном свете. Затем добавляли реагент (в ЗФР); время инкубации: 30 мин, КТ, при дневном свете. Клетки промывали с помощью 2 мл ЗФР и пеллетировали центрифугированием. Добавляли вторичное антитело для окрашивания (антитело к дигоксигенину-флуоресцеину, Fab-фрагменты (Roche, 1207741)) и инкубировали в течение 30 мин, 4°C, в темноте. Клетки отмывали с помощью 2 мл ЗФР и пеллетировали центрифугированием. После чего клетки ресуспендировали в 0,5 мл ЗФР. Оценку образцов осуществляли с помощью устройства FACS-Scan (фиг.2).

Пример 15Функциональный анализ для определения ингибирующей способности  
антител в отношении передачи hOX40/hOX40L-сигнала («NF $\kappa$ B-анализ»)

Клетки линии HeLa дикого типа (wt) и клетки линии HeLa, экспрессирующие человеческий OX40 (HeLa\_OX40), выращивали в минимальной поддерживающей среде (MEM), 1× Na-пируват, 1× заменимые аминокислоты (фирма Gibco), 10% FCS и в случае рекомбинантных клеток + 600 мкг/мл G418. K562-клетки и K562-клетки, экспрессирующие OX40L, выращивали в ISF-O-среде, и в случае рекомбинантных клеток добавляли 200 мкг/мл G418.

Клетки линии HeLa\_wt или HeLa\_OX40 высевали с плотностью  $3 \times 10^4$  клеток/100 мкл в 96-луночные планшеты без G418 и инкубировали в течение ночи в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки линии K562\_wt или K562\_OX40L вносили, исходя из соотношения клетка-клетка 1:1. Фиксированные в формалине или не фиксированные в формалине клетки K562, экспрессирующие OX40L (замороженные при -70°C), подвергали оттаиванию и разводили в соотношении 1:10 в MEM/10%FCS; клетки линии K562\_OX40L предварительно инкубировали с антителом к OX40L в течение 30 мин при КТ. Время стимуляции с использованием клеток линии K562\_OX40L составляло от 30 до 150 мин. Экстракцию белка из клеточных ядер осуществляли согласно инструкции поставщика к NE-набору от фирмы Active Motif. Для определения передачи OX40-сигнала, приводящего к активации NF $\kappa$ B, использовали TransAM NF $\kappa$ B-ELISA от фирмы Active Motif (анализ осуществляли согласно инструкциям поставщика). Измерения осуществляли по абсорбции при длине волны 450/620 с помощью Тесан МТР-ридера (фиг.3). Установлено, что значения IC<sub>50</sub> для всех антител LC составляют от 0,6 до 5нМ.

Пример 16Анализ Т-клеточной активации

Принцип анализа:

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

сверхэкспрессирующих OX40L. В таких условиям анализа активированные Т-клетки при инкубации в течение 24 ч при 37°С продуцировали IL-2. Цитокин определяли в супернатанте с помощью ELISA. Для выявления блокирующего действия МАт клетки линии K562\_OX40L предварительно до совместного культивирования с PBL инкубировали в течение 1 ч с соответствующими разведениями антитела.

*10*                   Метод:

Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBL) отделяли из гепаринизированной цельной крови путем центрифугирования в *15* градиенте плотности Histopaque®-1077 (фирма Sigma). После отмычки раствором Хэнкса подсчитывали количество клеток с использованием раствора Турка и клетки ресуспендировали при концентрации  $10^6$ /мл в среде RPMI 1640 *20* (фирма Gibco), дополненной пенициллином, стрептомицином и глутамином (Gibco 10378-016) и 10% FBS. Контрольные клетки K562 (дикий тип) поддерживали в такой же аналогично дополненной среде RPMI. Клетки K562, *25* трансфектированные OX40L, поддерживали в такой же среде, дополненной генетицином (G418, фирма Gibco) в конечной концентрации 50 мг/мл. Клетки K562 (либо WT, либо OX40L+) разводили такой же средой из расчета  $1,5 \times 10^5$  *30* клеток/мл и вносили в каждую лунку 96-луночного планшета для культуры ткани по  $50$  мкл/лунку ( $0,75 \times 10^4$ /лунку). К клеткам добавляли соответствующие разведения МАт в объеме 20 мкл/лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. *35* Каждое разведение тестировали в двух лунках. Добавляли PBL в объеме 100 мкл/лунку ( $10^5$  клеток/лунку). Конечное соотношение PBL и клеток K562 составляло ~13:1. ФГА (10×) (Sigma L-9132) добавляли из расчета 20 мкл/лунку *40* (конечная концентрация 0,75 мкг/мл). Общий объем на лунку доводили до 200 мкл с помощью RPMI/10% FCS. Планшеты инкубировали при 37°С в увлажняющем 5% CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 24 ч. После центрифугирования планшетов супернатанты собирали и определяли IL-2 с помощью ELISA (BD, *45* Сан-Диего, шт. Калифорния, кат. №2627KI) согласно спецификациям производителя (фиг. 4). Для расчета значений IC<sub>50</sub> (концентрация МАт, блокирующая на 50% высвобождение IL-2 стимулированными OX40L PBL) *50* фоновую концентрацию IL-2, обнаруженную в контрольных культурах

(PBL+ФГА+K562WT), вычитали из общей концентрации IL-2, которая 5  
продуцировалась PBL, стимулированными клетками K562×OX40L+ (фиг. 5). IC<sub>50</sub>  
TAG34: 0,07мкМ; LC.001: 2нМ; LC.005: 10нМ. Значения IC<sub>50</sub> составляли от 2 до  
10нМ.

### Пример 17

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

15 Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из гепаринизированной крови с помощью фиколл-пака. В большинстве случаев для этого анализа применяли свежевыделенные PBMC. В некоторых случаях применяли также криогенно законсервированные PBMC. Среда для этого 20 анализа представляла собой RPMI, содержащую 10% мужской АВ-сыворотки (фирма Sigma-Aldrich); 2мМ глутамин и Pen/Strep (готовая к применению смесь антибиотика пенициллина и стрептомицина (фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия); лиофилизат восстанавливали в 20 мл; применяли 2 мл на 1000 мл 25 среды).

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

35 На следующий день в лунки добавляли токсOID столбняка (TT) (фирма Chiron Behring) в конечной концентрации от 2 до 5 мкг/мл. Применяемые в качестве положительного контроля лунки (максимум пролиферации/стимуляции) содержали только TT, во все остальные лунки добавляли антитела (в виде очищенного IgG) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В анализ включали мышиное МАт TAG-34 (конечная концентрация 10 мкг/мл). В качестве контроля нестимулированного фона использовали только среду. Все анализы 40 осуществляли в трех повторностях.

45 После дополнительной стимуляции в течение 6 дней (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% влажность) добавляли <sup>3</sup>H-тимидин в конечной концентрации 1 мКи/мл и после дополнительного 16-часового периода инкубации планшеты собирали и определяли включенный <sup>3</sup>H-тимидин с помощью счетчика бета-лучей (фиг.6).

50 Пример 18

Перекрестная реактивность антител к OX40L и мышенному OX40L

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

## Результаты:

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

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

Пример 19

Способность HuМАт к OX40L активировать систему комплемента

Оценка с помощью C1q- C3c-связывающего ELISA

Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, индуцировать связывание C1q и активацию C3, планшет для ELISA сенсибилизировали серийно разведенным антителом и контрольными антителами. В качестве отрицательного контроля использовали человеческий IgG4 (фирма The Binding Site, Бирмингем, Великобритания), который очень слабо связывается с C1q. Человеческий IgG1 (фирма The Binding Site) и альфа-KLH (IgG1) применяли в качестве положительных контролей. Затем сенсибилизирующие антитела инкубировали с рекомбинантным C1q или пулом человеческой сыворотки в качестве источника C3. Для выявления связывания C1q использовали кроличье антитело к C1q (фирма DAKO) в сочетании со свиным антителом к кроличьему IgG, конъюгированным с пероксидазой из хрена (HRP) (фирма DAKO). Для выявления активированного C3c (полученного в результате активации C3) применяли мышьюное антитело к человеческому C3c (фирма DAKO) в сочетании с кроличьим антителом к мышенному IgG, конъюгированным с HRP (фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Вест Гров, шт. Пенсильвания). Для оценки различий в эффективности сенсибилизации, сенсибилизирующие антитела визуализировали с помощью козьего антитела к человеческому IgG, конъюгированного с HRP. Расчеты значений EC<sub>50</sub> или максимального связывания при 10 мкг/мл (B<sub>max</sub>) изученных HuМАт проводили на основе нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость реакции от дозы с вариабельным наклоном) с помощью программы Graphpad Prism.

Результаты:

LC.001, предлагаемое в и изобретении, обладало способностью эффективно связываться с C1q, о чем свидетельствует значение EC<sub>50</sub> 2,19±0,42 мкг/мл и значение B<sub>max</sub> (ОП405) 3,089. Кроме того, установлено, что оба применяемые в

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

В свете способности связываться с C1q, обнаружено, что отложение С3с при использовании LC.001 зависит от концентрации антитела, при этом значение EC<sub>50</sub> составляло 2,67±0,16 мкг/мл и значение Bmax (ОП405) 2,614. Кроме того, оба применяемые в качестве положительного контроля антитела, т.е. человеческий IgG1 и антитело к KLH, могли эффективно вызывать отложение С3с, о чем свидетельствуют значения EC<sub>50</sub>, составляющие 5,45±0,36 мкг/мл и 2,16±0,26 мкг/мл соответственно и значения Bmax (ОП405), составляющие 2,543 и 2,633 соответственно. Как и ожидалось, применяемый в качестве отрицательного контроля человеческий IgG4, не вызывал отложения С3с, о чем свидетельствует значение Bmax при ОП405, составляющее 0,095. Кроме того, LC.001IgG4x, предлагаемое в изобретении, обладало пониженной способностью вызывать отложения С3с, о чем свидетельствует значение Bmax при ОП405, составляющее 0,090. (фиг.8 и 9).

#### Пример 20

##### Способность HuМАт к OX40L связываться с Fcγ-рецепторами I, IIa и IIb

Индуцируемая IgG антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) опосредуется Fcγ-рецепторами (FcγR) на эффекторных клетках. Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, связываться с FcγR клетки линии ПА1.6 (полученные путем ограничивающего разведения из клеток линии ПА1; Jones B. и др., J. Immunol. 136, 1986, сс. 348-356), стабильно трансфектированные человеческими FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, и клетки дикого типа инкубировали с серийно разведенным антителом и контрольными антителами. В качестве отрицательных контролей использовали

человеческий IgG2 (фирма The Binding Site, Великобритания), который не связывается с Fc $\gamma$ RI, и человеческий IgG4 (фирма The Binding Site), который не связывается с Fc $\gamma$ RII. В качестве положительных контролей в эксперимент 5 включали человеческий IgG1 (фирма The Binding Site), связывающийся с Fc $\gamma$ RI, и человеческий IgG3 (фирма The Binding Site), связывающийся с Fc $\gamma$ RII.

Обнаружение связанных антител осуществляли с помощью FACS-анализа с 10 использованием антитела к человеческому IgG, конъюгированное с фикоэритрином (ФЭ). Расчеты значений EC<sub>50</sub> или максимального связывания при 10 мкг/мл (Bmax) изученных HuMAT проводили на основе нелинейной 15 регрессии (сигмоидальная зависимость реакции от дозы с вариабельным наклоном) с помощью программы Graphpad Prism.

Установлено, что LC.001 обладает способностью эффективно связываться с 20 Fc $\gamma$ RI (эффективность сопоставима с контрольным антителом IgG1), о чем свидетельствуют значение EC<sub>50</sub> 0,11±0,03 мкг/мл и значение Bmax (MFI) 8041,54, но не обладает способностью связываться с Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIb, о чем 25 свидетельствуют значения Bmax (MFI) 25,06 и 21,18 соответственно.

Для LC.001IgG4x характерна более низкая эффективность в отношении 30 связывания с Fc $\gamma$ RI по сравнению с LC.001, и по эффективности это антитело сопоставимо с контрольным антителом IgG4, значение EC<sub>50</sub> 0,86±0,12 мкг/мл и значение Bmax (MFI) 6030,07. Обнаружено отсутствие связывания LC.001 IgG4x 35 с Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIb (при этом значения Bmax (MFI) составляли 21,40 и 19,27 соответственно), в то время как контрольное антитело IgG3 обладало способностью связываться с этими рецепторами (значения Bmax (MFI) 536,65 и 418,59 соответственно) (фиг.10). Таким образом, значение EC<sub>50</sub>, 40 характеризующее связывание с Fc $\gamma$ RI, для LC.001IgG4x в 8 раз выше, чем значение EC<sub>50</sub> антитела LC.001.

### Пример 21

#### Способность HuMAT к OX40L связываться с Fc $\gamma$ RIIIa на NK-клетках

Для определения способности антител, предлагаемых в изобретении, 45 связываться с Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) на естественных клетка-киллерах (NK), выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и инкубировали с 20 50 мкг/мл антитела HuMAT и контрольных антител в присутствии 20 мкг/мл

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

Установлено, что LC.001 обладает способностью эффективно связываться с Fc $\gamma$ RIIIa (эффективность сопоставима с контрольным антителом IgG1), о чем свидетельствует значение B<sub>max</sub> (MFI), составляющее 641,37. Добавление блокирующего антитела к Fc $\gamma$ RIIIa приводило к отсутствию связывания LC.001 с NK-клетками (значение B<sub>max</sub> (MFI) 194,61, ср. со значением фонового окрашивания 145,38). LC.001 IgG4x не связывалось с Fc $\gamma$ RIIIa и по этой характеристики сопоставимо с контрольным антителом IgG4, значение B<sub>max</sub> (MFI) 170,52, т.е. значение B<sub>max</sub> LC.001 IgG4x составляет примерно только 10% от значения B<sub>max</sub> LC.001. Добавление блокирующего антитела к Fc $\gamma$ RIIIa не оказывало воздействие на связывание LC.001 IgG4x, значение (B<sub>max</sub> (MFI) 174,26) (фиг.11).

### Пример 22

Воздействие hMat\_hOX40L и MAT TAG-34 на связывание с HUVEC (первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека/ фирма PromoCell)

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

Клетки линии HUVEC подвергали оттаиванию и размножали в среде ECG-M, дополненной 2% FCS, в течение 4 дней в T175-колбах (фирма Sarstedt).  
 Клетки высевали в 24-луночные планшеты (10000 клеток/лунку).

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

Антитело <KLH> использовали в качестве неспецифического отрицательного контроля.

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

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

Таблица 7

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

	МАт, применяемое для понижающей модуляции	МАт, применяемое для окрашивания	Вторичное МАт для FACS	MFI
5	5. LC.001	-	<h>	36,52
10	6. LC.001	LC.001	<h>	38,58
15	7. Контрольная среда	-	<m>	3,66
20	8. Контрольная среда	TAG-34	<m>	31,81
25	9. <KLH>	-	<m>	3,68
30	10. <KLH>	TAG-34	<m>	30,79
35	11. TAG-34	-	<m>	9,44
40	12. TAG34	TAG-34	<m>	8,97
45				14,89

Пример 23Анализ методом Вестерн-блоттинга TAG34, LC.001 и LC.005

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

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

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

LC.005 : 1,1 мкл (1,6 мкг)/ 4 мл

TAG34: 1,6 мкл (1,6 мкг)/ 4 мл

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

Перечень ссылок

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

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

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

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

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

35

40

45

50

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> Ф.Хоффманн-Ля Рош АГ

10 <120> Антитела к OX40L

<130> 22672 WO

<150> EP 04022158

15 <151> 2004-09-17

<150> EP 04030546

<151> 2004-12-23

<160> 69

20 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

25 <213> искусственная

<220>

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

30 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 2  
 <211> 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь, вариабельная область LC.001

5

&lt;400&gt; 2

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

10

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

35

Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
						115	120

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; легкая цепь, вариабельная область LC.005

45

&lt;400&gt; 3

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

50

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

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

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

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

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

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

20 <210> 4  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

25 <220>  
 <223> тяжелая цепь, вариабельная область LC.005

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

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

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

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

30 <210> 7  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> легкая цепь, вариабельная область LC.029

35 <400> 7  
 Met Leu His Pro Leu Cys Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Val Ala  
 1 5 10 15

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

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

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

50 <210> 8  
 <211> 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

5 &lt;223&gt; тяжелая цепь, вариабельная область LC.029

&lt;400&gt; 8

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
				115		120		

45

<210>	9
<211>	57
<212>	PRT
<213>	искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; легкая цепь, вариабельная область LC.019

50

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

55

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

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

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

10 <210> 10  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> тяжелая цепь, вариабельная область LC.019  
 15 <400> 10

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

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

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

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

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

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

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

45 Thr Val Ser Ser  
 115

45 <210> 11  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> искусственная  
 50 <220>  
 <223> легкая цепь, вариабельная область LC.033 (a)

&lt;400&gt; 11

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь, вариабельная область LC.033

35

&lt;400&gt; 12

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

40

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

45

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

50

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                       115                    120

15 <210> 13  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

20 <220>  
 <223> легкая цепь, константная область  
 <400> 13

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 14  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь, константная область (гамма 1)

&lt;400&gt; 14

5

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

10

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

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

15

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

20

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

25

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

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 10 245 250 255

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

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

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

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

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

30 <210> 15  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

35 <220>  
 <223> тяжелая цепь, константная область (гамма 4)

<400> 15

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

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

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

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

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

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

10 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

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

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

20 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

25 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

30 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

35 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

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

45 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

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

50 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

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

5                    Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
                       325

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

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

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

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

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

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

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

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

45                    Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
                       100

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

50                    <220>  
                       <223> тяжелая цепь, вариабельная область LC.059

&lt;400&gt; 17

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

5

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

10

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

15

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

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

20

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

25

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

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
					115			120							

30

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

35

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; легкая цепь, вариабельная область LC.060

&lt;400&gt; 18

40

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

45

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

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

50

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

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

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

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

15 <210> 19  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

20 <220>  
 <223> тяжелая цепь, вариабельная область LC.060

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
     115

50 <210> 20  
 <211> 120

<212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

5 <220>  
 <223> тяжелая цепь, вариабельная область LC.063

<400> 20

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

10

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

35

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

40

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

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 21

45

Ser Tyr Thr Met His  
 1 5

50

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

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 22

5

Ser Tyr Ala Met Ser  
 1 5

10

<210> 23  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

15

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 23

20

Asn Phe Gly Met His  
 1 5

25

<210> 24  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

30

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 24

35

Asn Tyr Gly Met His  
 1 5

40

<210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

45

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 25

Ser Tyr Ala Met Asn  
 1 5

50

<210> 26  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

<220>

&lt;223&gt; CDR / фрагмент антитела

&lt;400&gt; 26

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

Gly

10

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR / фрагмент антитела

20

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

25

Gly

30

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR / фрагмент антитела

35

&lt;400&gt; 28

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

40

Gly

45

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; искусственная

50

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR / фрагмент антитела

&lt;400&gt; 29

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

5 Gly

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

<220>  
*15* <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 30

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

20 Gly

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

*30*  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 31

Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
*35* 1 5 10 15

Gly Arg

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

*45*  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 32

Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
*50* 1 5 10 15

Gly Arg

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

10                  <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела

15                  <400> 33  
  
                   Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr  
                   1                       5                           10

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

25                  <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела

30                  <400> 34  
  
                   Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr  
                   1                       5                           10

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

40                  <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела

45                  <400> 35  
  
                   Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe  
                   1                       5

50                  <210> 36  
                   <211> 12  
                   <212> PRT  
                   <213> искусственная

                  <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела

                  <400> 36  
  
                   Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
                   1                       5                           10

5                   <210> 37  
                 <211> 12  
                 <212> PRT  
                 <213> искусственная

10                 <220>  
                 <223> CDR / фрагмент антитела

15                 <400> 37  
                 Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro  
                 1                       5                           10

20                 <210> 38  
                 <211> 11  
                 <212> PRT  
                 <213> искусственная

25                 <220>  
                 <223> CDR / фрагмент антитела

30                 <400> 38  
                 Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr  
                 1                       5                           10

35                 <210> 39  
                 <211> 11  
                 <212> PRT  
                 <213> искусственная

40                 <220>  
                 <223> CDR / фрагмент антитела

45                 <400> 39  
                 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
                 1                       5                           10

50                 <210> 40  
                 <211> 12  
                 <212> PRT  
                 <213> искусственная

                <220>  
                 <223> CDR / фрагмент антитела

                <400> 40  
                 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
                 1                       5                           10

5  
<210> 41  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> искусственная

5  
<220>  
<223> CDR / фрагмент антитела  
<400> 41

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

15  
<210> 42  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> искусственная

15  
<220>  
<223> CDR / фрагмент антитела  
20 <400> 42

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

25  
<210> 43  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> искусственная

30  
<220>  
<223> CDR / фрагмент антитела  
<400> 43

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

40  
<210> 44  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> искусственная

45  
<220>  
<223> CDR / фрагмент антитела  
<400> 44

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
1 5 10 15

50 Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala  
20

5  
 <210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

10  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 45

15  
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5

15  
 <210> 46  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

20  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 46

25  
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

30  
 <210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

35  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 47

40  
 Met Pro Pro Val Trp Lys Val  
 1 5

45  
 <210> 48  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 48

50  
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> искусственная  
 5  
 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 49

10 Leu His Pro Leu Cys Lys Val  
 1 5

15 <210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

20 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 50

Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser  
 1 5

25 <210> 51  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

30 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 51

35 Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr  
 1 5

40 <210> 52  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

45 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела  
 <400> 52

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

50 <210> 53

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

5                   <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 53

10                  Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr  
                   1                               5

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

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела

20                  <400> 54

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Gln Tyr Thr  
 1                                       5

25                  <210> 55  
                   <211> 7  
                   <212> PRT  
                   <213> искусственная

30                  <220>  
                   <223> CDR / фрагмент антитела  
                   <400> 55

35                  Gln Gln Arg Ser Asn Trp Thr  
                   1                               5

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

<220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела

45                  <400> 56

Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr  
 1                                       5

50                  <210> 57  
                   <211> 9

<212> PRT  
 <213> искусственная

5 <220>  
 <223> CDR / фрагмент антитела

<400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Trp Thr Phe  
 1 5

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20                    Gly Lys  
 450

<210> 59

<211> 450

25 <212> PRT

<213> искусственная

<220>

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

30 <400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

15

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

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

25

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

25

Gly Lys  
450

30

<210> 60  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> искусственная

35

<220>  
<223> тяжелая цепь LC\_001 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

1400 60

40

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

45

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

45

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

40 <210> 61  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>  
 <223> легкая цепь LC.001

45 <400> 61

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

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

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

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

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

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

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

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

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

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

30

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

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

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

45 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

50

<210> 62  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

<220>  
 <223> тяжелая цепь LC.005 (человеческий IgG1-тип)

&lt;400&gt; 62

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

5

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

10

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

15

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

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

20

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

25

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

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

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

10

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

35

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

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

40

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

45

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

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

50

Gly Lys  
 450

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

5

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

&lt;400&gt; 63

10

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

15

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

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

20

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

25

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

30

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

85														95	
Ala	Arg	Asp	Ser	Ser	Ser	Trp	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
100														110	

35

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

40

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

45

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

50

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

180														190
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----

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

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

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

10

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

15

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

20

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

25

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

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

Gly Lys  
 10 450

<210> 64  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 15 <213> искусственная

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

20 <400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 <223> легкая цепь LC.005

<400> 65

1                    5                    10                    15  
30

20                    25                    30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

25

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

30

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

<400> 66

35

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

40

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

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

45

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

35

<210> 67

<211> 449

<212> PRT

40 <213> ИСКУССТВЕННАЯ

<220>

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

45 <400> 67

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

Lys

50

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; тяжелая цепь LC.060 (S228P, человеческий IgG4-мутант)

&lt;400&gt; 68

5

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

10

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

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

35

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

40

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

45

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

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 69  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> искусственная

10 <220>  
 <223> легкая цепь LC.060

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 130 135 140

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
210

## Формула изобретения

1. Антитело, которое связывается с OX40L человека, отличающееся тем, что  
содержит Fc-фрагмент, полученный из организма человека, и не связывается с  
фактором комплемента C1q, а также включает комбинацию вариабельных областей,  
независимо друг от друга выбранных из группы, включающей следующие  
комбинации:

20 а) вариабельная область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельная область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO:2;

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

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

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

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

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

40 2. Антитело, которое связывается с OX40L человека, отличающееся тем, что содержит Fc-фрагмент, полученный из организма человека, и не связывается с фактором комплемента C1q, и включает в качестве

а) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:58 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:61,

б) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:62 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:65 или

в) тяжелой  $\gamma$ -цепи SEQ ID NO:66 и легкой каппа-цепи SEQ ID NO:69.

45 3. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело представляет собой Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- или одноцепочечный фрагмент.

4. Антитело по п.2, отличающееся тем, что антитело представляет собой Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- или одноцепочный фрагмент.

<sup>50</sup> 5. Вектор, предназначенный для обеспечения экспрессии молекулы антитела, которое связывается с OX40L человека, и содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело по п.1.

6. Вектор, предназначенный для обеспечения экспрессии молекулы антитела, которое связывается с OX40L человека, и содержащий молекулу нуклеиновой

кислоты, кодирующую антитело по п.2.

7. Клетка-хозяин, предназначенная для получения молекулы антитела, которое связывается с OX40L человека, и включающая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по п.1.

8. Клетка-хозяин, предназначенная для получения молекулы антитела, которое связывается с OX40L человека, и включающая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по п.2.

9. Способ получения антитела, которое связывается с OX40L человека и содержит Fc фрагмент, полученный из организма человека, отличающийся тем, что культивируют клетку-хозяина, включающую вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по п.1 или 2,

в условиях, которые обеспечивают синтез молекулы антитела, и выделяют молекулу антитела из культуры.

10. Способ получения антитела, которое связывается с OX40L человека, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по п.1, модифицируют таким образом, чтобы это модифицированное антитело не связывалось с фактором комплемента C1q и/или человеческим Fc $\gamma$ -рецептором на NK-клетках, встраивают указанную модифицированную первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, в экспрессионный вектор, встраивают вектор в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, культивируют клетку-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез антитела, и выделяют антитело из культуры.

11. Способ получения антитела, которое связывается с OX40L человека, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по п.2, модифицируют таким образом, чтобы это модифицированное антитело не связывалось с фактором комплемента C1q и/или человеческим Fc $\gamma$ -рецептором на NK-клетках, встраивают указанную модифицированную первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, в экспрессионный вектор, встраивают вектор в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, культивируют клетку-хозяина в условиях, которые обеспечивают синтез антитела, и выделяют антитело из культуры.

12. Композиция, предназначенная для индукции иммунного ответа к OX40L человека и содержащая молекулу антитела по п.1 в дозовом количестве 0,1 мг/кг.

13. Композиция, предназначенная для индукции иммунного ответа к OX40L человека и содержащая молекулу антитела по п.2 в дозовом количестве 0,1 мг/кг.

14. Диагностическая композиция для обнаружения воспалительных заболеваний, содержащая молекулу антитела по п.1 в дозовом количестве 0,1 мг/кг.

15. Диагностическая композиция для обнаружения воспалительных заболеваний, содержащая молекулу антитела по п.2 в дозовом количестве 0,1 мг/кг.

16. Фармацевтическая композиция для лечения и профилактики воспалительных заболеваний, содержащая антитело по п.1 в дозовом количестве 0,1 мг/кг, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

17. Фармацевтическая композиция для лечения и профилактики воспалительных заболеваний, содержащая антитело по п.2 в дозовом количестве 0,1 мг/кг, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

18. Применение антитела по п.1 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для профилактики и лечения воспалительных заболеваний.

19. Применение антитела по п.2 для приготовления лекарственного средства,

предназначенного для профилактики и лечения воспалительных заболеваний.

*5*

*10*

*15*

*20*

*25*

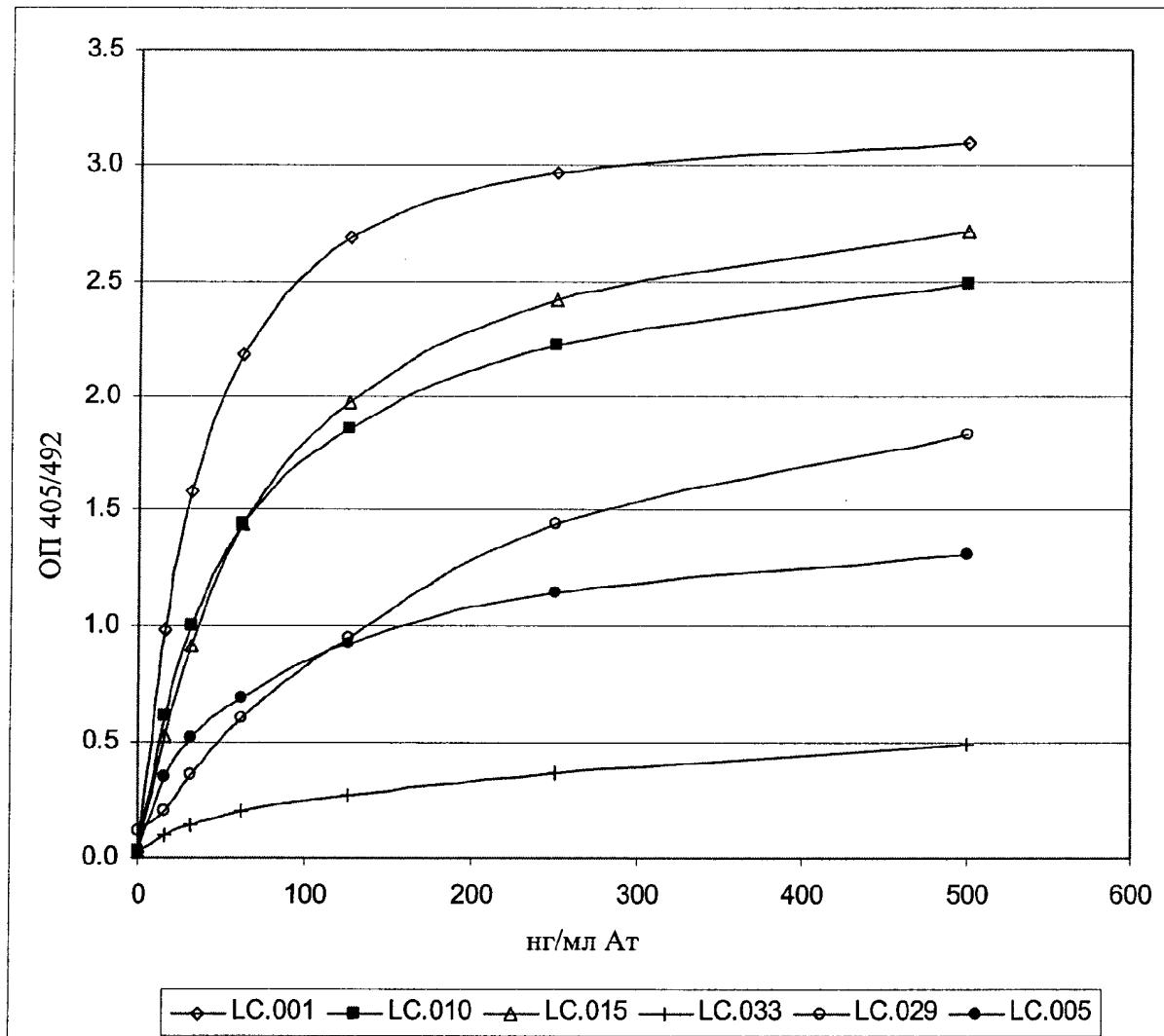
*30*

*35*

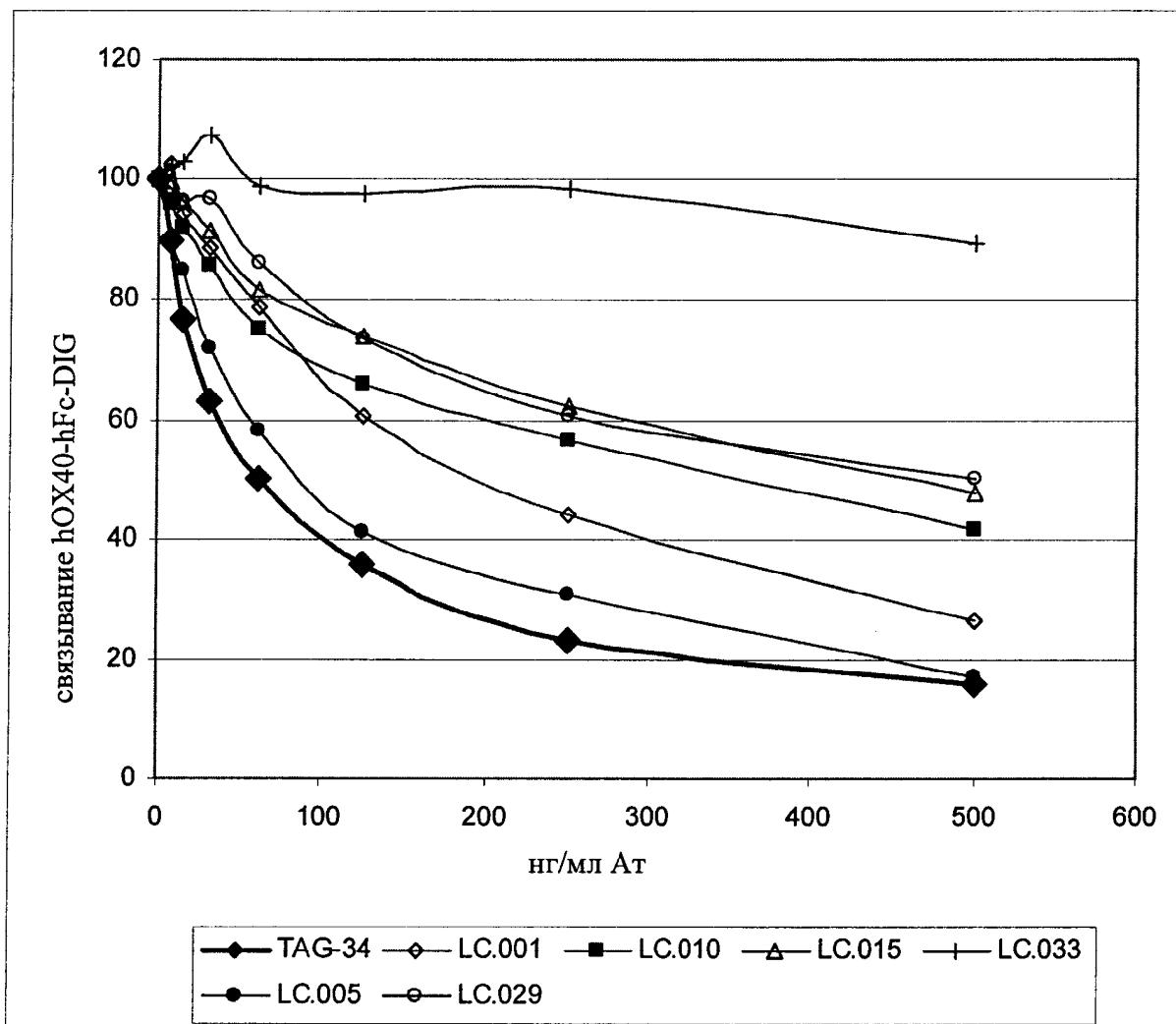
*40*

*45*

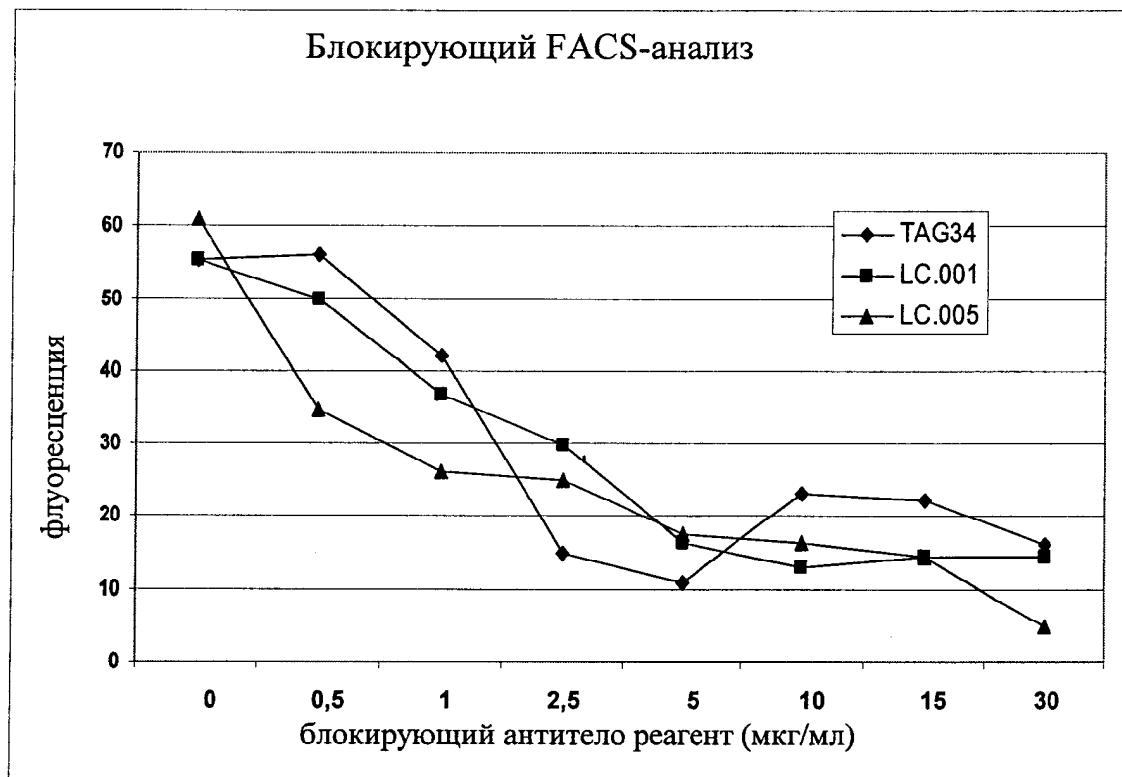
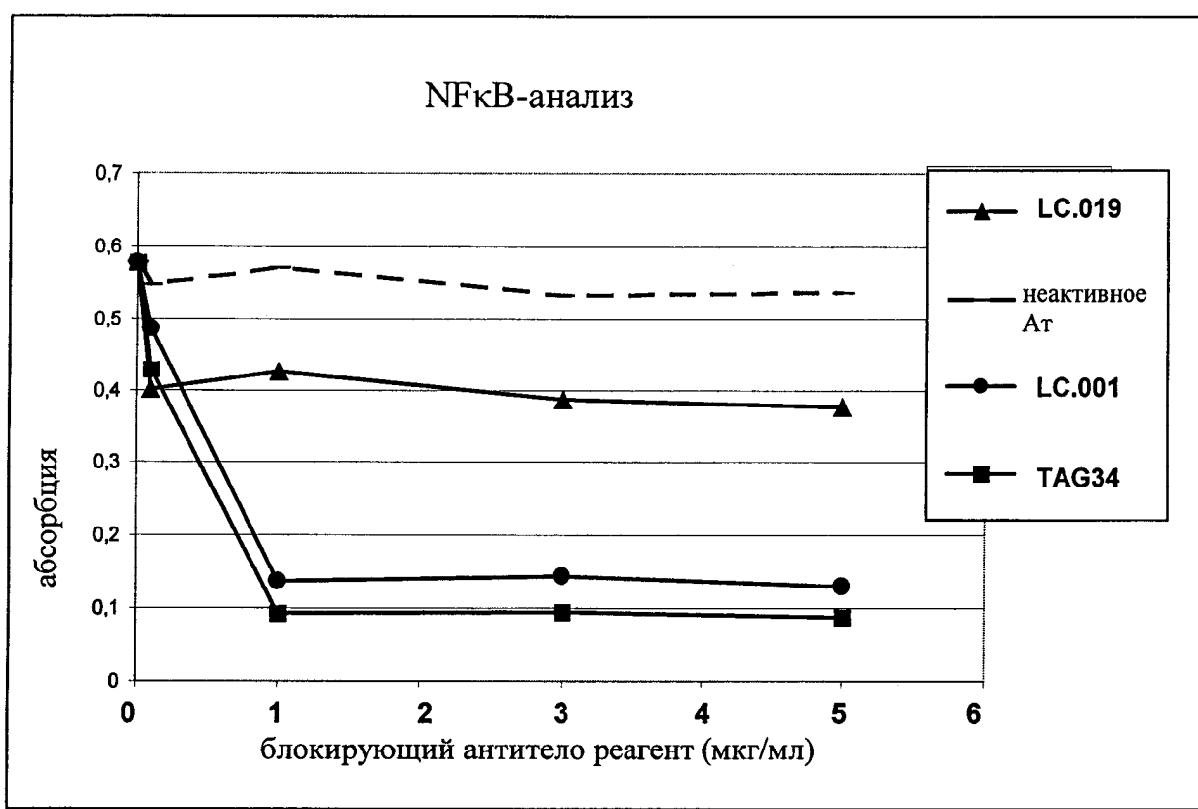
*50*

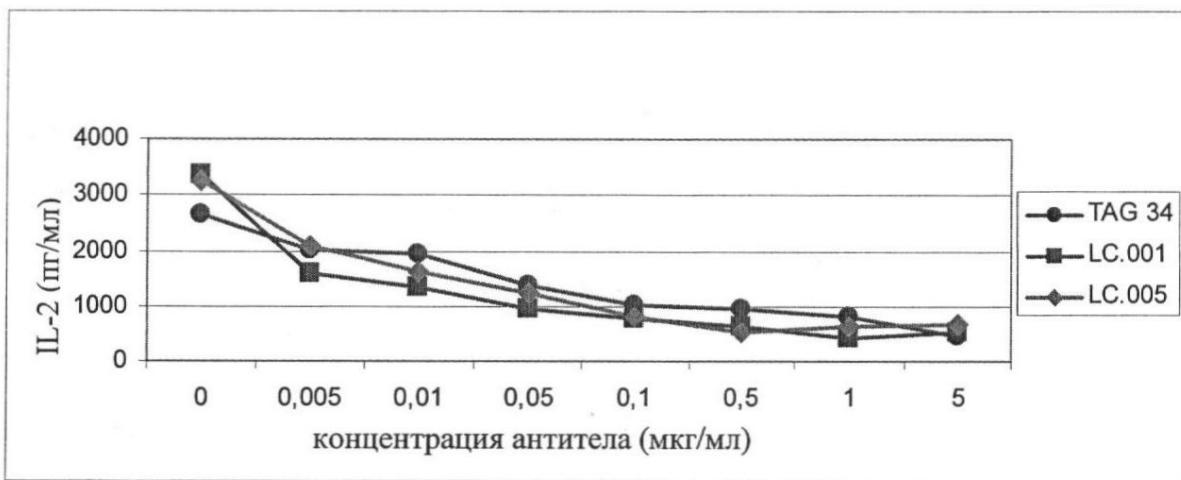


Фиг. 1а

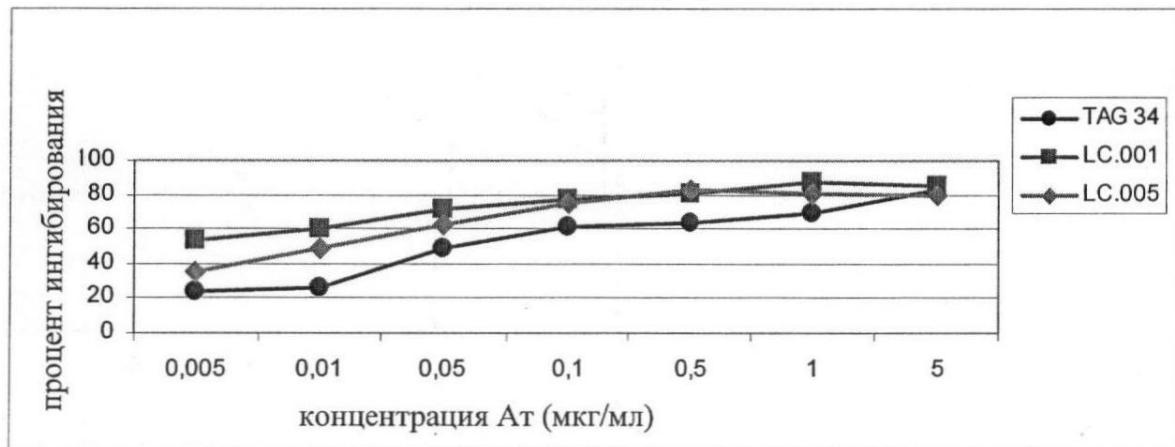


Фиг. 16

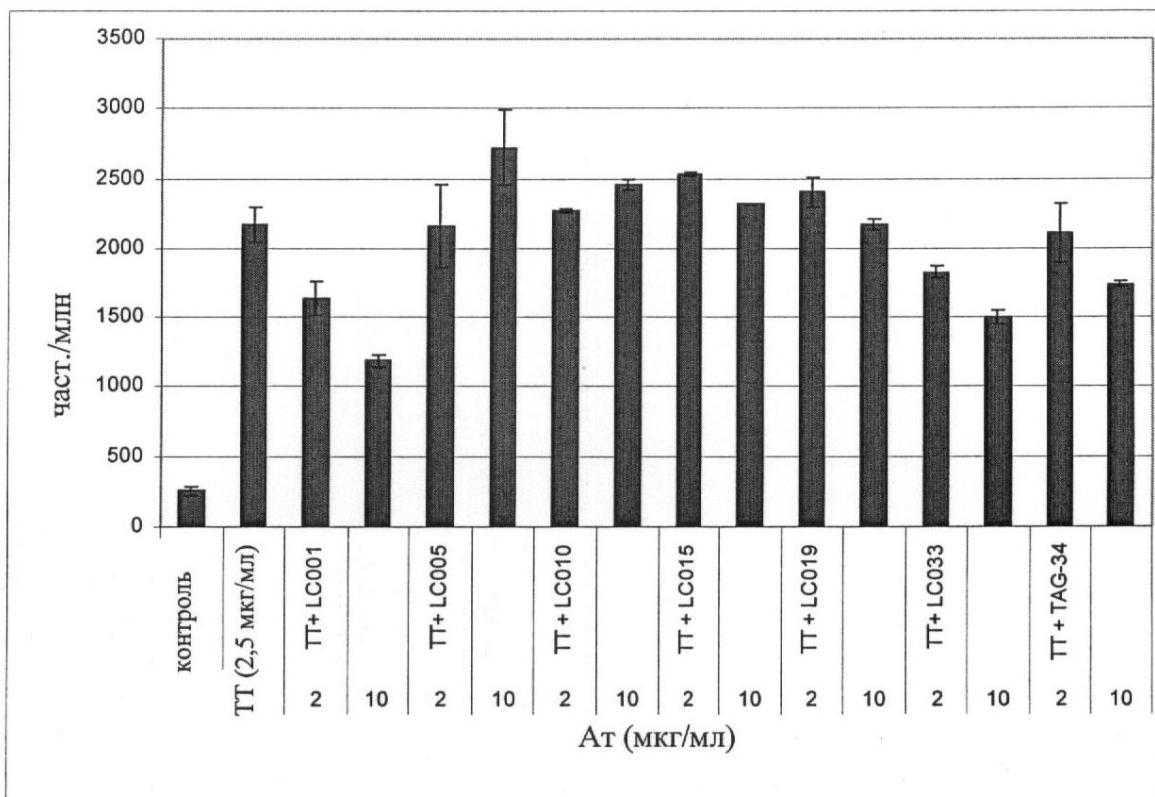
**Фиг. 2****Фиг. 3**



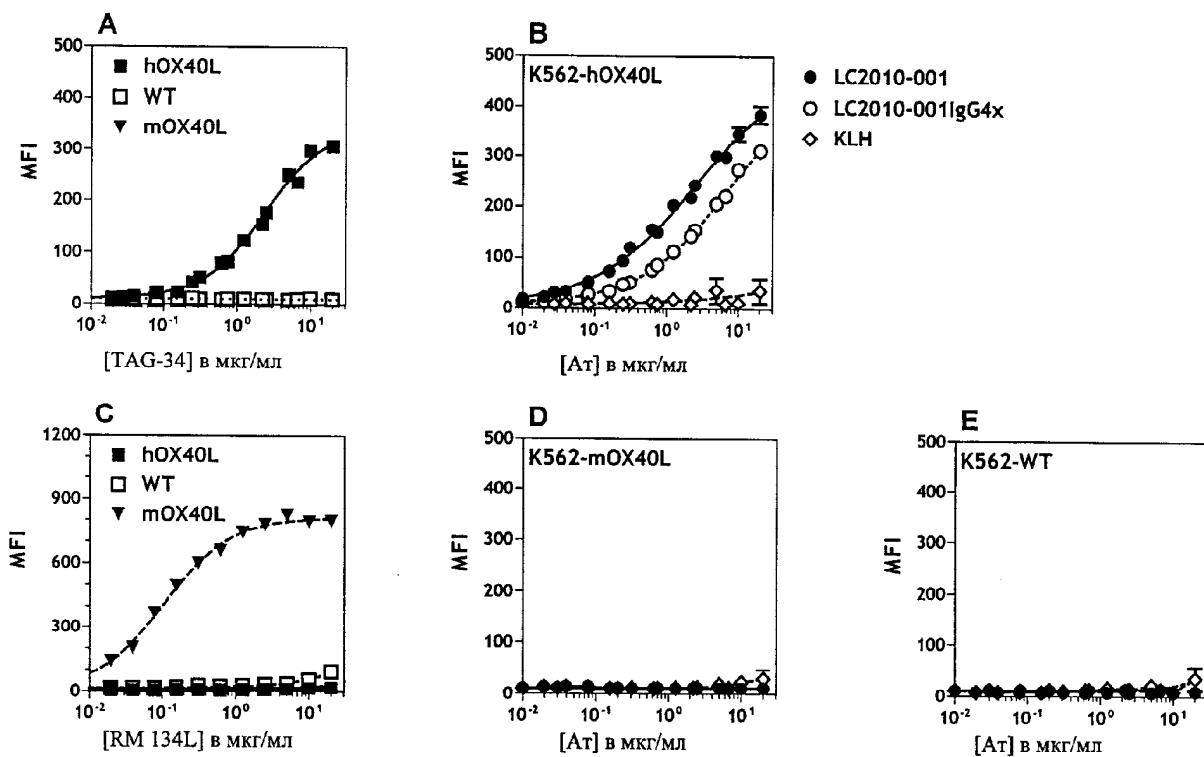
Фиг. 4



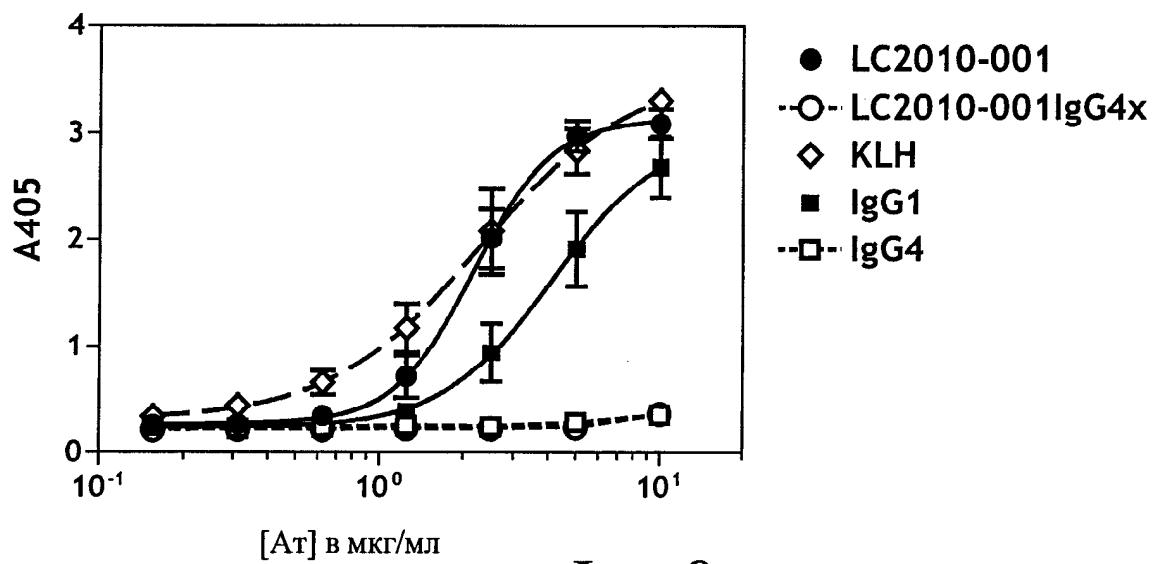
Фиг. 5



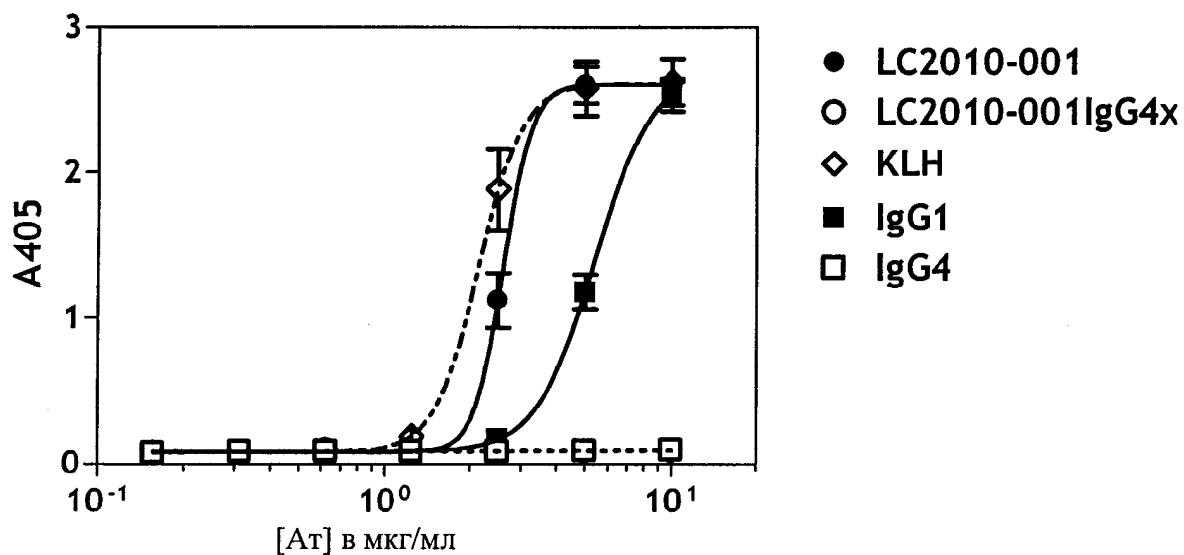
Фиг. 6



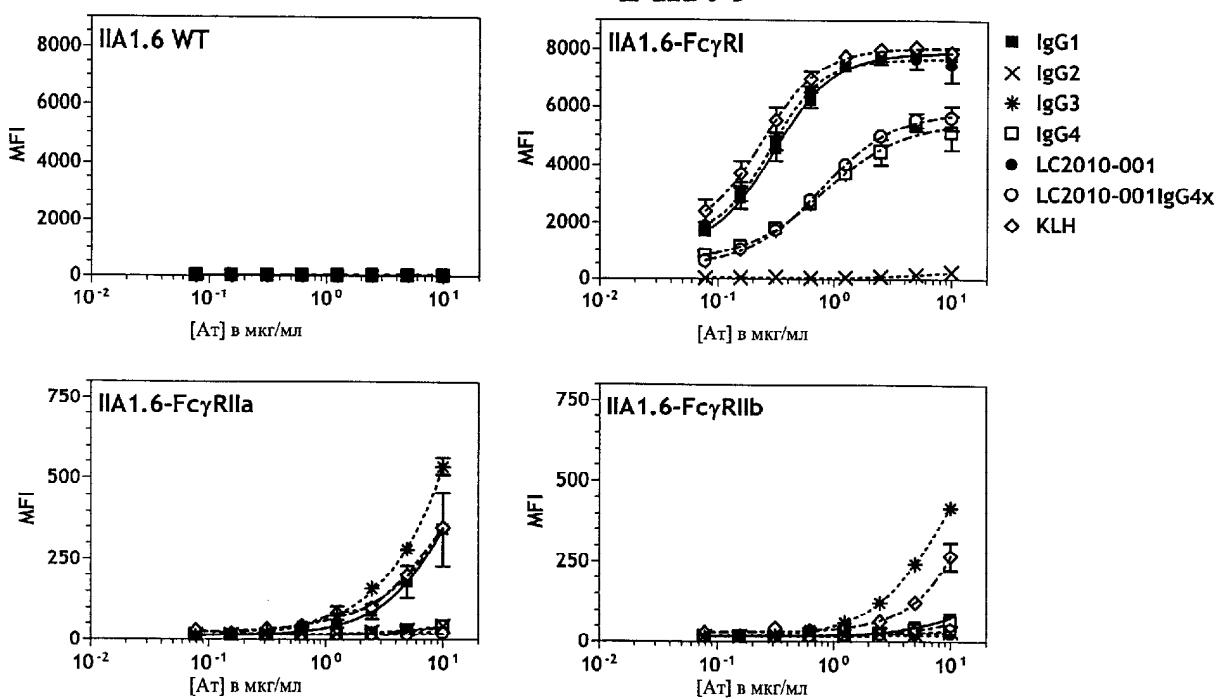
Фиг. 7



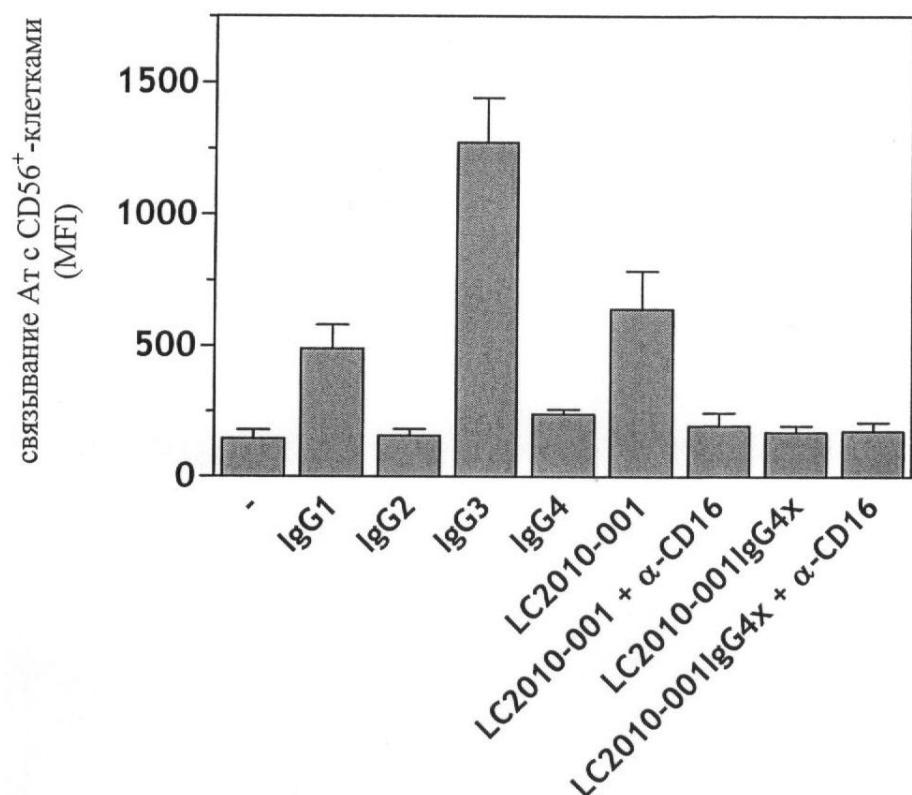
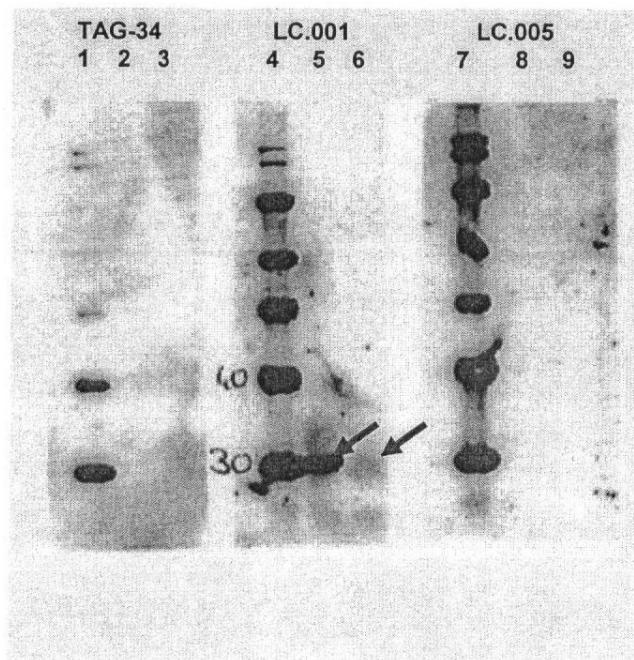
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

**Фиг. 11****Фиг. 12**