



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119319** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00
A61P 37/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2015 08893</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.03.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.06.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13159794.0</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 18.03.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.02.2016, Бюл.№ 3</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2019, Бюл.№ 11</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/NL2014/050162, 18.03.2014</p>	<p>(72) Винахідник(и): Сімонс Петрус Йоханнес (NL), Бун Луїс (NL), Ло Цзіньцюань (US), Брезскі Рендалл (US), Голдберг Моніка (US)</p> <p>(73) Власник(и): БІОСЕРОКС ПРОДАКТС Б.В., Yalelaan 46, NL-3584 CM Utrecht, The Netherlands (NL), ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ІНК., 1125 Trenton-Harbourton Rd, Titusville, New Jersey 08560, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013028231 A1, 28.02.2013 WO 2012027328 A2, 01.03.2012 WO 9942585 A1, 26.08.1999 WO 2006119107 A2, 09.11.2006 US 2010285036 A1, 11.11.2010 WO 2008079849 A2, 03.07.2008 WO 2008128455 A1, 30.10.2008</p>
---	---

(54) ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИТІЛО ДО CD134 (OX40) І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного гуманізованого антитіла, яке зв'язується з CD134 людини. Також винахід стосується виділеної молекули нуклеїнової кислоти, вектору, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, клітини-хазяїна, способу підсилення імунної відповіді у суб'єкта, фармацевтичної композиції та виділеного агоністичного антитіла, яке зв'язується з CD134 людини.

UA 119319 C2

Дана заявка на патент претендує на пріоритет на підставі заявки EP13159794.0, поданої 18 березня 2013 року.

Область техніки

5 Даний винахід відноситься до антитіл, до застосування таких антитіл і, зокрема, до гуманізованих антитіл, які зв'язуються з CD134, для лікування раку.

Рівень техніки

10 Підсилення протипухлинної функції Т-клітин являє собою унікальний підхід для лікування раку. Існує значна кількість свідчень того, що пухлинні клітини "вислизують" від імунної системи шляхом індукції активної імунної толерантності, опосередкованої, головним чином, регуляторними Т-лімфоцитами (Treg; Quezda et al. Immunol Rev 2011; 241:104-118). Внаслідок цього, як представляється, рівновага між ефекторними (тобто прямо або опосередковано знищуючими пухлинні клітини) Т-лімфоцитами (Teff) і викликаючими імунну толерантність (тобто придушення ефекторної функції і виживаності Teff) Treg є ключовим для здійснення ефективною протипухлинної імунотерапії. Інакше кажучи, ефективна протипухлинна імунна відповідь може бути отримана шляхом підсилення ефекторної функції пухлино-специфічних Teff і/або шляхом послаблення супресорної функції пухлино-специфічних Treg. Ключовим рецептором, який, як було показано, опосередковує дані відповіді, є рецептор CD134 (OX40). (Sugamura, K, Ishii, N, Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. Nature Rev Imm 2004; 4: 420-431).

20 CD134 (також відомий як OX40, TNFRSF4 і ACT35) є членом суперсімейства рецептора фактора некрозу пухлини. Даний поверхневий костимулюючий рецептор CD134 експресується на активованих Т-лімфоцитах і відіграє важливу роль у виживанні і функціонуванні даних клітин. Присутність CD134-експресуючих Т-лімфоцитів була продемонстрована в різних злоякісних пухлинах людини і у дренуючих лімфатичних вузлах пацієнтів, що страждають від раку (Ramstad et al. Am J Surg 2000; 179: 400-406; Vetto et al. Am J Surg 1997; 174: 258-265).

25 Зв'язування рецептора CD134 миші *in vivo* (злитими білками розчинного ліганда OX40 миші (OX40L) і муноглобуліну, або міметиками OX40L миші, такими як специфічні антитіла проти CD134 миші) у мишей, що мають пухлину, підсилює протипухлинний імунітет, призводить до виживаності без ознак пухлини на мишачих моделях різних клітинних ліній злоякісних пухлин мишей, наприклад, лімфоми, меланоми, саркоми, раку товстої кишки, раку молочної залози і гліоми (Sugamura et al. Nature Rev Imm 2004; 4: 420-431).

30 Було запропоновано підсилювати імунну відповідь ссавця на антиген із залученням OX40R за допомогою застосування засобу, що зв'язує OX40R (публікація міжнародного патенту № WO 99/42585). Хоча даний документ відноситься, у цілому, до засобів, що зв'язують OX40, у зазначеному документі зроблено акцент на застосуванні OX40L або його частин; опис антитіл проти OX40 проводять у контексті того, що вони еквівалентні OX40L. У цьому зв'язку, коли група Weinberg (Weinberg et al. J Immunother 2006; 29: 575-585) проводила дослідження на нелюдиноподібних мавпах, знову свідомо було обрано антитіло, яке зв'язується із сайтом зв'язування OX40L і, як правило, виступає міметиком OX40L.

40 Al-Shamkhani із співавт. (Eur J Chem 1996; 26: 1695-1699) застосовували антитіло проти OX40 за назвою OX86, яке не блокує зв'язування OX40L, з метою вивчити диференціальну експресію OX40 на активованих Т-клітинах миші; і Hirschhorn-Сумерман із співавт. (J Exp Med 2009; 206: 1103-1116) застосовували OX86 разом із циклофосфамідом в якості потенційної хіміоімунотерапії в моделі на мишах. Однак не очікується, що OX86 буде зв'язуватися з OX40 людини і, з огляду роботи Weinberg, при виборі антитіла, яке буде ефективним для людини, дослідник буде вибирати антитіло, яке зв'язується із сайтом зв'язування OX40L.

45 Зв'язування рецептора CD134 людини *in vivo* (специфічними антитілами проти CD134 людини, які взаємодіють із OX40L-зв'язуючим доменом на CD134 людини; US 2009/0214560 A1) на мишах з тяжкою комбінованою імунною недостатністю (TK1H) підсилює протипухлинний імунітет, що призводить до інгібування росту пухлини на різних лініях клітин злоякісних пухлин людини, наприклад, лімфоми, раку передміхурової залози, раку товстої кишки і раку молочної залози.

50 Точні механізми протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої зв'язуванням CD134 людини, у людини ще не встановлені, однак вважають, що дані типи відповіді опосередковує трансмембранний шлях передачі сигналів за участю CD134, який стимулюється взаємодією з OX40L. Дана взаємодія опосередкована зв'язуванням тримірного OX40L з CD134. У сучасних варіантах протиракової терапії запропоновано застосування тримеризованого ліганда OX40 в якості більш ефективного засобу, ніж антитіла проти OX40 (Morris et al. Mol Immunol 2007; 44: 3112-3121).

60 Короткий опис винаходу

Відповідно до даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка містить

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з Фігурою 27 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

5 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з Фігурою 27 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Відповідно до даного винаходу також запропонована зв'язуюча молекула, яка містить

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з Фігурою 26 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

10 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з Фігурою 26 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу виділені зв'язуючі молекули зв'язуються з CD134 людини. Зв'язуючі молекули згідно із даним винаходом можуть не

15 запобігати зв'язуванню рецептора CD134 (OX40) людини з лігандом OX40 (OX40L).
Такі зв'язуючі молекули включають підходящі антитіла проти CD134, антиген-зв'язуючі фрагменти антитіл проти CD134 і похідні антитіл проти CD134. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула зв'язується з CD134 людини з K_d , що становить 1×10^{-7} М або менше. Зв'язуюча молекула має агоністичну активність щодо CD134 людини на

20 Т-ефекторних клітинах і/або антагоністичну активність щодо CD134 людини на Т-регуляторних клітинах. Відповідно деяким наступним варіантам реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою моноклональне антитіло людини, яке специфічно зв'язується з CD134 людини з K_d , що становить 100 нМ або менше, наприклад, менше 50 нМ або менше 20 нМ.
Відповідно до даного винаходу також запропонована композиція, яка містить одну або

25 декілька зазначених зв'язуючих молекул і фармацевтично прийнятний носій. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зазначена зв'язуюча молекула являє собою моноклональне антитіло людини проти CD134 або антиген-зв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла. Зазначена композиція може також містити додаткові фармацевтичні засоби, такі як імунотерапевтичні засоби, хіміотерапевтичні засоби і гормональні терапевтичні засоби.
Відповідно до даного винаходу також запропоновані діагностичні і терапевтичні способи застосування зв'язуючих молекул. Згідно з деякими варіантами реалізації відповідно до даного

30 винаходу запропоновано спосіб лікування або запобігання раку в ссавця, що включає введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули або композиції, що містить зв'язуючу молекулу, описану в даній заявці. Відповідно деяким іншим варіантам реалізації даного винаходу в даному описі запропоновано спосіб підсилення імунної відповіді в ссавця, що включає введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули або композиції, що містить зв'язуючу молекулу. Згідно з деякими

35 варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула, яку застосовують у зазначених способах, являє собою моноклональне антитіло людини проти CD134 або антиген-зв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла, який зв'язується з CD134 людини, причому зазначене антитіло не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 (OX40) людини з лігандом OX40 (OX40L).

У даному винаході також запропоновані молекули нуклеїнової кислоти, які кодують амінокислотну послідовність зв'язуючої молекули, вектори, що містять такі нуклеїнові кислоти, клітини-господарі, що містять зазначені вектори, і способи одержання зазначених зв'язуючих молекул.

45 У даному описі також запропоновані інші аспекти, які будуть зрозумілі з повного опису, включаючи формулу винаходу.

Опис фігур

50 Фігура 1. Залежність від часу і ефект дози при впливі ФГА-М (фітогемагглютиніну-М) на експресію поверхневого CD134 людини Т-лімфоцитами людини.

Фігура 2. Експресія CD134 людини на спочиваючих і активованих ФГА-М CD4 Т-лімфоцитах людини.

Фігура 3. Характеристики зв'язування клону АСТ35, клону 12Н3 і клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини на стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

55 Фігура 4. Зв'язування клону 12Н3 і клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини на стимульованих ФГА-М CD4 Т-лімфоцитах і CD8 Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

Фігура 5. Перехресна конкуренція неміченого клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини з комерційним клоном АСТ35 або клоном L106 антитіла миші проти CD134, кон'югованим з ФЕ (фікоеритрином), на стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

Фігура 6. Одночасне зв'язування клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини з ОХ40L людини на стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

5 Фігура 7. Залежності від часу ефекту впливу стимулюючих бусин з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини на експресію поверхневого CD134 людини ефекторними Т-лімфоцитами (Teff) і регуляторними Т-лімфоцитами (Treg) людини.

Фігура 8. Ефект дози при впливі клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини на проліферацію стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

10 Фігура 9. Ефект об'єднання клону 12Н3 антитіла миші проти CD134 людини з ОХ40L людини або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини з ОХ40L людини на проліферацію стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

Фігура 10. Ефект впливу клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини на проліферацію стимульованих стимулюючими бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини ефекторних Т-лімфоцитів людини, експресуючих CD134 людини.

15 Фігура 11. Ефект впливу клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини на проліферацію стимульованих стимулюючими бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини регуляторних Т-лімфоцитів людини, експресуючих CD134 людини.

20 Фігура 12. Ефект клону 12Н3 антитіла миші проти CD134 людини на опосередковану ОХ40L людини проліферацію ефекторних (А) і регуляторних (В) Т-лімфоцитів людини, стимульованих стимулюючими бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини, експресуючих CD134 людини.

25 Фігура 13. Ефект впливу клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини на опосередковану регуляторними Т-лімфоцитами людини, експресуючими CD134 людини, супресію проліферації Т-ефекторних лімфоцитів людини, експресуючих CD134 людини.

30 Фігура 14. Зв'язування клону 20Е5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (з додаванням і без додавання ІЛ-2) на стимульованих бусинами CD3/CD28 CD4 Т-лімфоцитах і CD8 Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

Фігура 15. Ефект клону 20Е5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або ОХ40L людини на проліферацію стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

35 Фігура 16. Ефект дози при впливі клону 20Е5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або ОХ40L людини на проліферацію стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

Фігура 17. Ефект об'єднання клону 20Е5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з ОХ40L людини на проліферацію стимульованих ФГА-М Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

40 Фігура 18. Ефект клону 20Е5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або ОХ40L людини (з додаванням і без додавання ІЛ-2) на проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

45 Фігура 19. Зв'язування клонів 12Н3 і 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини з невідновленим і відновленим рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fcγ людини. (А) Аналіз у нередукуючих (а, b) і редукуючих (с, d) (В) Характер електрофоретичної рухливості рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fcγ людини (рлCD134) у нередукуючих (а, b) і редукуючих (с, d) умовах із застосуванням офарблювання кумаси діамантовим (С) Вестерн-Блотинг у нередукуючих (а, b) і редукуючих (с, d) умовах рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fcγ людини після впливу контрольного антитіла миші ізотипу IgG1к (mIgG1) або клонів 12Н3 і 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини (m12Н3 і m20Е5, відповідно).

50 Фігура 20. Схематичне зображення цистеїн-багатих доменів (CRD) у повнорозмірному CD134 людини (позначена як "CRD1") і в різних усічених формах CD134 людини (позначені як "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "усічений (ус) CRD4").

55 Фігура 21. Зв'язування клонів 12Н3 і 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини на клітинній лінії 293-F, тимчасово трансфікованою конструкцією повнорозмірного CD134 людини (позначена "CRD1") або різними усіченими конструкціями CD134 людини (позначені "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "усічений (ус) CRD4").

Фігура 22. Зв'язування клонів 12Н3 і 20Е5 химерного антитіла IgG4к і/або IgG1к людини проти CD134 людини на клітинній лінії 293-F, тимчасово трансфікованою конструкцією

повнорозмірного CD134 людини (позначена "CRD1") або різними усіченими конструкціями CD134 людини (позначені "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "усічений (ус) CRD4").

5 Фігура 23. Зв'язування клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини (A) і клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (B) з пептидом, отриманим з CD134 людини, що відповідає амінокислотній послідовності A1-модуля усіченого CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677 683).

Фігура 24. Варіабельні області моноклонального антитіла 20E5.

10 Варіабельні області миші (м20E5VH і м20E5VL); варіабельні області важких ланцюгів гуманізованого антитіла 20E5 (л20E5_h1, л20E5_h2 і л20E5_h3) і варіабельні області легких ланцюгів гуманізованого антитіла 20E5 (л20E5_l1 і л20E5_l2). м20E5VH: SEQ ID NO: 4; м20E5VL: SEQ ID NO 5.

Фігура 25. Варіабельні області моноклонального антитіла 12H3.

15 Варіабельні області миші (м12H3VH і м12H3VL); варіабельні області важких ланцюгів гуманізованого антитіла 12H3 (л12H3_h1, л12H3_h2 і л12H3_h3) і варіабельні області легких ланцюгів гуманізованого антитіла 12H3 (л12H3_l1 і л12H3_l2). м12H3VH: SEQ ID NO: 12; м12H3VL: SEQ ID NO: 13.

Фігура 26. Варіабельні області гуманізованого антитіла 20E5.

Фігура 27. Варіабельні області гуманізованого антитіла 12H3.

20 Фігура 28. Характеристики зв'язування версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 20E5 гуманізованого антитіла IgG4к людини проти CD134 людини із приєднаним до планшета рекомбінантним CD134 людини.

Фігура 29. Характеристики зв'язування версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 12H3 гуманізованого антитіла IgG4к людини проти CD134 людини із приєднаним до планшета рекомбінантним CD134 людини.

25 Фігура 30. Характеристики зв'язування біотинильованого батьківського клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини із приєднаним до планшета рекомбінантним CD134 людини.

Фігура 31. Характеристики конкуренції гуманізованих версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з біотинильованим батьківським клоном 12H3 антитіла миші проти CD134 людини (у концентрації EC₅₀, що становить 20 нг/мл) за зв'язування з приєднаним до планшета рекомбінантним CD134 людини.

Фігура 32. Рівні експресії повнорозмірного CD134 людини на клоні № 5 (A) і на клоні № 23 (B) стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

35 Фігура 33. Характеристики зв'язування гуманізованих версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 20E5 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з поверхневим CD134 людини на клоні № 5 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

Фігура 34. Характеристики зв'язування гуманізованих версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з поверхневим CD134 людини на клоні № 5 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

40 Фігура 35. Характеристики зв'язування версій гуманізованих VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з поверхневим CD134 людини на клоні № 23 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

45 Фігура 36. Зв'язування гуманізованих версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3, VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини на клітинній лінії 293-F, тимчасово трансфікованою конструкцією повнорозмірного CD134 людини (позначена "CRD1") або різними конструкціями усіченого CD134 людини (позначені "CRD3" і "CRD4").

50 Фігура 37. Зв'язування гуманізованої версії VL1H1 клону 20E5 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини на клітинній лінії 293-F, тимчасово трансфікованою конструкцією повнорозмірного CD134 людини (позначена "CRD1") або різними конструкціями усіченого CD134 людини (позначені "CRD3" і "CRD4").

Фігура 38. Характеристики зв'язування клону 12H3 біотинильованого батьківського антитіла миші проти CD134 людини з поверхневим CD134 людини на клоні № 5 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

55 Фігура 39. Характеристики конкуренції гуманізованих версій VL1H1, VL1VH2, VL1VH3 (A) і VL2H1, VL2VH2, VL2VH3 (B) клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини з біотинильованим батьківським клоном 12H3 антитіла миші проти CD134 людини (у концентрації EC₅₀, що становить 700 нг/мл) за зв'язування з поверхневим CD134 людини на клоні № 5 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F.

60 Фігура 40. Понижувальна регуляція експресії FOXP3 на експандованих Treg (CD4+CD25+CD127 dim/-) розчинним OX40L і розчинним антитілом IgG1 12H3 миші проти

CD134 людини у зазначених концентраціях. На осі Y представлена середня геометрична інтенсивність флуоресценції (геом. СІФ) FOXP3, встановлена із застосуванням антитіла проти FOXP3, приєднаного до ФЕ. m12H3=IgG1 12H3 миші. Дані являють собою результат аналізу зразка, отриманого від одного донора, у трьох повторах.

5 Фігура 41. Стовпчикова діаграма аналізів FACS, що демонструє ослаблення інгібуючого ефекту Treg на проліферацію Teff приєднаним до планшета гуманізованим антитілом 12H3 VL1VH1 проти CD134 людини у порівнянні з контрольним ізотипом. Клітини Teff виявляли за допомогою барвника Celltrace™ Violet. Співвідношення Treg:Тефекторні становило 1:2.

10 Фігура 42. Ефект зазначених приєднаних до планшета антитіл проти CD134 людини на проліферацію Teff клітин у співвідношенні Treg:Teff 0:1 (без Treg) (фігура 42A) або 1:4 (фігура 42B), виділених від донора 7015, відкладений на графіку як функція індексу реплікації. M=миші; x=химерний; л=людини. *p<0,05; **p<0,01;***p<0,001 у порівнянні з контрольним ізотипом mlgG1. OX40L людини використовували разом з (OX40L) або без (OX40L без His) антитіл проти His.

15 Фігура 43. Вирівнювання гуманізованих варіабельних областей (VH) важкого ланцюга, отриманих з батьківського антитіла 20E5 миші проти CD134 людини. SEQ ID NO зазначений для кожної послідовності наприкінці назви кожної послідовності (20E5_VH1_64 = амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 64 і т.д.).

20 Фігура 44. Вирівнювання гуманізованих варіабельних областей (VH) важкого ланцюга, отриманих з батьківського антитіла 12H3 миші проти CD134 людини. SEQ ID NO зазначений для кожної послідовності наприкінці назви кожної послідовності (12H3_VH1_69 = амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 69 і т.д.).

Опис винаходу

Активация Т-клітин опосередкована не лише стимуляцією антигеном через рецептори Т-клітин, але також костимулюючими сигналами від костимулюючих молекул. Серед декількох костимулюючих молекул OX40 (CD134), член сімейства рецептора фактора некрозу пухлини (ФНП), відіграє ключову роль у виживаності і гомеостазі ефекторних Т-клітин і Т-клітин пам'яті. Згідно із загальноприйнятим розумінням стимуляції OX40, взаємодія між OX40 і лігандом OX40 (OX40L) здійснюється, коли активовані Т-клітини зв'язуються із професійними антиген-презентуючими клітинами (АПК). Після цього функції Т-клітин, у тому числі продукція цитокінів, експансія і збереження життєздатності, підсилюються костимулюючими сигналами OX40. Взаємодія між OX40 і OX40L здійснюється під час взаємодії Т-клітин і дендритних клітин (ДК) через 2-3 дні після розпізнавання антигену. Т-клітини, що експресують OX40, також можуть взаємодіяти із клітинами, експресуючими OX40L, відмінними від ДК, і одержувати сигнал OX40 від клітини, яка може генерувати важливі сигнали для утворення Т-клітин пам'яті, підсилення відповіді Th2 і пролонгації запальних відповідей. Таким чином, оптимальна взаємодія між OX40 і OX40L може відбуватися у два етапи: OX40L, який експресується на активованих CD4 Т-клітинах, взаємодіє з OX40, який експресується на інших реактивних CD4 Т-клітинах, що призводить до оптимального утворення CD4 Т-клітин пам'яті (Soroosh et al. J Immunol 2006; 176: 5975-87), або OX40L, який експресується на CD4+ акцесорних клітинах, може стимулювати збереження життєздатності клітини Th2 у результаті взаємодії з OX40 на клітинах Th2 (Kim et al. Immunity 2003;18: 643-54). Крім того, експресія OX40L на В-клітинах необхідна для утворення Th2 in vivo, але не для утворення Th1 (Linton et al. J Exp Med 2003; 197: 875-83), і гладкі клітини, що експресують OX40L, прямо підсилюють ефекторну функцію Т-клітин у результаті взаємодії між OX40 на Т-клітинах і OX40L на гладких клітинах (Kashiwakura et al. J Immunol 2004; 173: 5247-5257; Nakae et al. J Immunol 2006; 176: 2238-2248). Крім цього, оскільки ендотеліальні клітини також експресують OX40L (Imura et al. J Exp Med 1996; 183: 2185-95), зв'язування OX40 з ендотеліальними клітинами може бути залучене у васкулярне запалення. Надлишок сигналів OX40, спрямованих як до реактивних Т-клітин, так і до регуляторних Т-клітин, пригнічує імунодепресію, опосередковану Treg. Сигнали OX40, що надходять у реактивні Т-клітини, роблять дані клітини стійкими до супресії, опосередкованої Treg. З іншого боку, сигнали OX40, що надходять у клітини Treg, прямо інгібують супресивну функцію Treg, хоча спірним залишається питання, чи можуть сигнали OX40 контролювати рівень експресії Foxp3 у клітинах Treg. Крім цього, навмисна стимуляція OX40 інгібує диференціацію клітин iTreg (індуцибельних клітин Treg), яка залежить від ТФР (трансформуючого фактора росту)-бета. Дане інгібування може бути опосередковане частково ефекторними цитокінами, такими як ІЛ-4 і ІФН-гама, які продукуються ефекторними Т-клітинами, стимульованими OX40. Важливо, що блокування OX40L значно стимулює диференціацію iTreg і викликає толерантність до трансплантата, яка може бути опосередкована клітинами Treg. Внаслідок цього OX40 являє собою можливу молекулярну мішень для контролю опосередкованого Т-клітинами аутоімунітету. Більше того, у нещодавніх дослідженнях повідомлялося, що взаємодія між OX40L, яка експресується гладкими

клітинами, і OX40, яка експресується клітинами Treg, може взаємно пригнічувати функцію гладких клітин і супресивну функцію клітин Treg (Gri et al. *Immunity* 2008; 29: 771-81; Piconese et al. *Blood* 2009;114: 2639-48).

5 Миші являють собою оптимальний експериментальний об'єкт для імунологів, і вивчення імунних відповідей мишей привело до глибокого розуміння сутнісних причин і взаємозв'язків у механізмах імунної системи людини. Загальна структура системи миші і людини представляється цілком аналогічною; однак також існують значні відмінності. Наприклад, у мишей CD134 експресується на Teff після активації, тоді як Treg експресують CD134 конститутивно (Piconese et al. *J Exp Med* 2008; 205: 825-839). У людини CD134 експресується як на Teff, так і на Treg винятково після активації (див. нижче, наприклад, приклад 2 (g), "Експресія CD134 на ефекторних і регуляторних Т-лімфоцитах людини після стимуляції стимулюючими бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини"). Більше того, Treg миші для досягнення супресії викликають апоптоз Teff миші (Pandiyan et al. *Nat Immunol* 2007; 8: 1353; Scheffold et al. *Nat Immunol* 2007; 8: 1285-1287), тоді як Treg людини для досягнення супресії не викликають апоптоз Teff людини (Vercoulen et al. *Plos ONE* 2009; 4: e7183). У сукупності ці дані свідчать про різні ролі CD134 у супресивній функції Treg в імунних системах людини і миші.

20 Термін "зв'язуюча молекула" охоплює (1) антитіло, (2) антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла і (3) похідну антитіла, кожний з яких визначений у даній заявці. Термін "зв'язується з CD134" або "зв'язування з CD134" відноситься до зв'язування зв'язуючої молекули, як визначено в даній заявці, з рецептором CD134 в аналізі *in vitro*, такому як аналіз Віасоге або аналіз Octet (на основі поверхневого плазмонного резонансу). Зв'язуюча молекула має афінність зв'язування (K_d), що становить приблизно 1×10^{-6} М або менше, наприклад, приблизно 5×10^{-7} М або менше, приблизно 1×10^{-7} М або менше, приблизно 1×10^{-8} М або менше, приблизно 1×10^{-9} М або менше, приблизно 1×10^{-10} М або менше, приблизно 1×10^{-11} М або менше або приблизно 1×10^{-12} М або менше.

30 Термін "виділене антитіло" або "виділена зв'язуюча молекула" відноситься до антитіла або зв'язуючої молекули, які: (1) не зв'язані із природними компонентами, з якими вони зв'язані в природньому стані; (2) вільні від інших білків того ж виду; (3) експресовані клітиною іншого виду; або (4) не існують у природі. Приклади виділених антитіл включають антитіло проти CD134, яке було очищене афінним способом із застосуванням CD134, антитіло проти CD134, отримане в гібридомих або інших клітинних лініях *in vitro*, гуманізовані антитіла проти CD134 і антитіло людини проти CD134, отримане від трансгенної тварини.

35 Термін "агоніст" відноситься до зв'язуючої молекули, як визначено в даній заявці, яка при зв'язуванні з CD134 (1) стимулює або активує CD134, (2) підсилює, стимулює, індукує, збільшує або продовжує активність, присутність або функцію CD134 або (3) підсилює, стимулює, збільшує або індукує експресію CD134. Термін "антагоніст" відноситься до зв'язуючої молекули, як визначено в даній заявці, яка при зв'язуванні з CD134 (1) інгібує або пригнічує CD134, (2) інгібує або пригнічує активність, присутність або функцію CD134 або (3) інгібує або пригнічує експресію CD134.

40 Термін "антитіло" відноситься до молекули імуноглобуліну, яка, як правило, складається із двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара містить один "важкий" (H) ланцюг і один "легкий" (L) ланцюг. Легкі ланцюги людини підрозділяють на капа (K) і лямбда (L). Важкі ланцюги підрозділяються на мю, дельта, гама, альфа або епсілон і визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgG, IgA і IgE, відповідно. Кожний важкий ланцюг містить варіабельну область важкого ланцюга (у даній заявці скорочено іменується як HCVR або VH) і константну область важкого ланцюга. Константні області важкого ланцюга IgD, IgG і IgA містять три домени, CH1, CH2 і CH3, і константні області важкого ланцюга IgM і IgE містять чотири домени, CH1, CH2, CH3 і CH4. Кожний легкий ланцюг містить варіабельну область легкого ланцюга (у даній заявці скорочено іменується як LCVR або VL) і константну область легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга містить один домен, CL. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканинами або факторами господаря, у тому числі з різними клітинами імунної системи (наприклад, ефекторними клітинами). Області VH і VL можна також розділити на області гіперваріабельності, які називають областями, що визначають комплементарність (complementarity determining regions, CDR), розділені областями, які є більш консервативними і які називають каркасними областями (frame regions, FR). кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, організованих від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області кожної пари важкий/легкий ланцюг (VH і VL), відповідно, як правило, утворюють сайт зв'язування антитіла. Розподіл амінокислот у кожній області або домені відповідають визначеннями Кебота

(Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 і 1991)) або відповідно до визначень Чотія (Chothia et al., Conformations of immunoglobulin hypervariable regions, Nature 1989; 342(6252):877-83). Термін "антитіло" охоплює антитіла миші, гуманізовані антитіла, антитіла людини і химерні антитіла, а також антитіло, яке являє собою мультимерну форму антитіла, такі як димери, тримери або мультимери більш високого порядку мономерних антитіл. Антитіло також охоплює моноспецифічні, біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, а також будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка містить антиген-, що розпізнає сайт необхідної специфічності. Даний термін також охоплює антитіло, зв'язане або приєднане до групи, відмінної від антитіла. Також термін "антитіло" не обмежений будь-яким конкретним способом одержання антитіла. Наприклад, даний термін включає моноклональні антитіла, рекомбінантні антитіла і поліклональні антитіла.

Термін "похідна антитіла" або "похідна" антитіла відноситься до молекули, здатної до зв'язування з тим самим антигеном (тобто CD134 людини), з яким зв'язується антитіло, що і містить амінокислотну послідовність антитіла, приєднану до додаткового молекулярного угруповання. Амінокислотна послідовність антитіла, що міститься в похідній антитіла, може являти собою повнорозмірне антитіло або може являти собою будь-яку частину або частини повнорозмірного антитіла. Додаткове молекулярне угруповання може являти собою біологічну або хімічну молекулу. Приклади додаткових молекулярних угруповань включають хімічні групи, пептиди, білки (такі як ферменти, антитіла), амінокислоти і хімічні сполуки. Додаткове молекулярне угруповання можна використовувати в якості засобу для виявлення, маркерної мітки, терапевтичного або фармацевтичного засобу. Амінокислотна послідовність антитіла може бути приєднана або пов'язана з додатковим угрупованням шляхом нековалентного зв'язування, хімічної комбінації, генетичного злиття або іншими способами. Термін "похідна антитіла" також охоплює химерні антитіла, гуманізовані антитіла і молекули, отримані в результаті модифікацій амінокислотних послідовностей антитіла CD134, таких як консервативні амінокислотні заміни, вставки і приєднання.

Термін "антиген-зв'язуючий фрагмент" антитіла відноситься до однієї або до декількох частин повнорозмірного антитіла, які зберігають здатність зв'язуватися з тим самим антигеном (тобто CD134 людини), з яким зв'язується антитіло. Термін "антиген-зв'язуючий фрагмент" також охоплює частину антитіла, яка є частиною більшої молекули, утвореної в результаті нековалентного або ковалентного зв'язування, або частини антитіла з однією або декількома додатковими молекулярними угрупованнями. Приклади додаткових молекулярних угруповань включають амінокислоти, пептиди або білки, такі як корова область стрептавідину, які можна використовувати для одержання тетрамірної молекули scFv (Kipriyanov et al. Hum Antibodies Hybridomas 1995; 6(3): 93-101). Типові антиген-зв'язуючі фрагменти являють собою VH і/або VL антитіла.

Термін "химерне антитіло" відноситься до антитіла, яке містить амінокислотні послідовності, отримані від двох різних видів, таких як людина і миша, як правило, комбінацію варіабельних областей (важкого і легкого ланцюга) миші і константних областей (важкого і легкого ланцюга) людини.

Термін "епітоп" відноситься до частини антигена, здатного до специфічного зв'язування з антитілом або з рецептором Т-клітин або будь-яким іншим способом взаємодіючої з молекулою. "Епітоп" також позначається в даній області техніки як "антигенна детермінанта". Епітоп, як правило, складається з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або вуглевод або бічні ланцюги цукрів. Епітоп може бути "лінійним" або "нелінійним/конформаційним". Коли бажаний епітоп визначений (наприклад, у результаті картування епітопів), можна одержати антитіла проти даного епітопа. Одержання і характеристика антитіл може також надавати інформацію щодо бажаних епітопів. Виходячи з даної інформації, потім можна провести скринінг антитіл для виявлення тих з них, які зв'язуються з тим самим епітопом, наприклад, у результаті проведення перехресних конкурентних досліджень для виявлення антитіл, які конкурентно зв'язуються один з одним, тобто антитіл, що конкурують за зв'язування з антигеном.

Термін "клітина-господар" відноситься до клітини, у яку був введений вектор експресії. Термін охоплює не тільки конкретну клітину-суб'єкт, але також нащадків такої клітини. Оскільки в послідовних поколіннях можуть виникати певні модифікації у зв'язку із впливом навколишнього середовища або мутації, таке потомство може не бути ідентичним батьківській клітині, але також буде включено в об'єм терміну "клітина-господар".

Термін "антитіло людини" ("людське антитіло") відноситься до антитіла, що містить амінокислотні послідовності винятково послідовності імуноглобуліну людини. Антитіло людини може містити вуглеводні ланцюги миші, якщо воно було отримано в миші, у клітині миші або в

гібридомі, отриманої із клітини миші. Антитіла людини можуть бути отримані багатьма способами, відомими у даній області техніки.

5 Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до антитіла, яке містить декілька або всі з CDR антитіла тварини, відмінні від людини, тоді як каркасні і константні області антитіла містять амінокислотні залишки, отримані з послідовностей антитіла людини. Гуманізовані антитіла, як правило, одержують шляхом трансплантації CDR з антитіла миші в послідовності каркасної області людини з наступною зворотною заміною певних залишків каркасної області людини відповідними залишками миші з вихідного антитіла. Термін "гуманізоване антитіло" також відноситься до антитіла, отриманого не від людини, у якій з метою зменшення імуногенності були вилучені, як правило, в одній або декількох варіабельних областях, один або декілька епітопів, що характеризуються високою ймовірністю утворення епітопа Т-клітини і/або В-клітини людини. Амінокислотну послідовність епітопа можна вилучити повністю або частково. Однак, як правило, амінокислотну послідовність змінюють шляхом заміни однієї або декількох амінокислот, які утворюють епітоп, однією або декількома іншими амінокислотами, за допомогою чого амінокислотна послідовність замінюється послідовністю, яка не утворює епітоп Т-клітини і/або В-клітини людини. Амінокислоти замінюють амінокислотами, які присутні у відповідному положенні (положеннях) у відповідній варіабельній області важкого або варіабельній області легкого ланцюга людини, залежно від ситуації.

20 Термін "сsaveць" відноситься до будь-якого виду тварин класу Ссавці. Приклади ссавців включають: людей; лабораторних тварин, таких як пацюки, миші, мавпи і морські свинки; свійських тварин, таких як кролики, велика рогата худоба, вівці, кози, кішки, собаки, коні і свині і подібних тварин.

25 Термін "виділена нуклеїнова кислота" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, отриманої від кДНК або, що має синтетичне походження, або до їхньої комбінації, відділеної від інших молекул нуклеїнових кислот присутніх у природному джерелі нуклеїнової кислоти.

30 Термін " K_d " відноситься до рівноважної константи дисоціації при взаємодії певного антитіла з певним антигеном і використовується для опису афінності зв'язування між лігандом (таким як антитіло) і білком (таким як CD134). Чим менша рівноважна константа дисоціації, тем міцніше зв'язування ліганда або тем вища афінність між лігандом і білком. Значення K_d можна виміряти методом поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, із застосуванням системи BIACORE 1 або Octet. Термін "антитіло проти CD134" відноситься до антитіла, як визначено в даній заявці, здатного зв'язуватися з CD134 людини.

35 Терміни "рецептор OX40", "рецептор CD134" і "CD134" використовуються в даній заявці взаємозамінно і включають CD134 людини, а також варіанти, ізоформи і види, гомологічні CD134 людини. Відповідно, молекули, що зв'язують CD134 людини, розкриті в даній заявці, можуть, у деяких випадках, також зв'язуватися з CD134 видів, відмінних від людини. Наприклад зв'язуючі молекули згідно із даним винаходом можуть мати перехресну реактивність із іншими спорідненими антигенами, наприклад, з CD134 інших видів, таких як людина або мавпа, наприклад, *Macaca fascicularis* (яванська макака, суно) або *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp). В інших випадках зв'язуючі молекули можуть бути повністю специфічними до CD134 людини і можуть не демонструвати видову або інші типи перехресної реактивності. Наприклад, дані молекули не будуть зв'язуватися з CD134 миші або пацюка.

45 Термін "специфічно зв'язується з CD134 людини" означає, що значення K_d зв'язуючої молекули при зв'язуванні з CD134 людини є меншим приблизно в 10 раз, 50 раз або 100 раз, ніж значення K_d при зв'язуванні даної молекули з, наприклад, CD40 людини, що визначають із застосуванням аналізу, описаного в даній заявці або відомого фахівцеві в даній області техніки (наприклад, аналізу BIACore).

50 В якості альтернативи, визначення того, що конкретний агент специфічно зв'язується з рецептором OX40 можна легко здійснити із застосуванням або адаптацією загальноприйнятих процедур. В одному з підходящих аналізів *in vitro* застосовують процедуру вестерн-блотингу (описану в багатьох стандартних керівництвах, у тому числі в "Antibodies, A Laboratory Manual" by Harlow and Lane). Для визначення того, що даний агент, що зв'язується з рецептором OX40, специфічно зв'язується з білком OX40 людини, із клітин ссавця, які не експресують антиген OX40, такий як клітини, відмінні від лімфоцитів (наприклад, клітина COS або клітина CHO), трансформованих молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує OX40, виділяють сумарний білок клітин. В якості негативного контролю сумарний білок клітин також виділяють із відповідних нетрансформованих клітин. Потім отримані препарати білків аналізують методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у неденатуруючих або денатуруючих умовах. Після цього білки переносять на мембрану (наприклад, нітроцелюлозну) методом вестерн-блотингу, і агент, дослідження якого проводять, інкубують з мембраною. Після промивання

мембрани для видалення агента, що неспецифічно зв'язався, присутність агента, що зв'язався, визначають із застосуванням антитіла, напрацьованого проти досліджуваного агента, кон'югованого із засобом для виявлення, таким як фермент лужна фосфатаза; застосування субстрату 5-бром-4-хлор-3-індоліл фосфату/нітроголубого тетразолію призводить до утворення густої синьої сполуки в результаті дії лужної фосфатази, приєднаної до антитіла. При використанні даної методики агенти, які специфічно зв'язуються з OX40 людини, будуть зв'язуватися зі смугою OX40 людини (яка буде розміщена в конкретному положенні на гелі, обумовленому молекулярною масою) в екстракті із трансформованих OX40 клітин, тоді як в екстракті з нетрансформованих клітин буде спостерігатися незначне зв'язування або зв'язування буде відсутнє. Неспецифічне зв'язування агента з іншими білками може виникнути і може бути виявлене у вигляді слабкого сигналу при проведенні вестерн-блотингу. Неспецифічну природу даного зв'язування фахівець у даній області техніки може розпізнати за слабким сигналом, отриманим при проведенні вестерн-блотингу, у порівнянні з потужним первинним сигналом, що виникає у результаті специфічного зв'язування агента/білка OX40 людини. В ідеалі агент, що зв'язується з рецептором OX40, не буде зв'язуватися з білками, виділеними з нетрансформованих клітин. Крім аналізів зв'язування із застосуванням екстрагованих білків, передбачувані агенти, що зв'язуються з рецептором OX40, можна досліджувати для підтвердження їхньої здатності зв'язуватися по суті тільки з рецептором OX40 in vivo шляхом кон'югації агента із флуоресцентною міткою (такою як ФІТЦ) і аналізу зв'язування даного агента з активованою антигеном популяцією CD4+T-клітин і неактивованою популяцією T-клітин методом сортування флуоресцентно-активованих клітин (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS). Засіб, який зв'язується по суті тільки з рецептором OX40, буде офарблювати тільки активовані CD4+T-клітини.

Термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної переносити іншу молекулу нуклеїнової кислоти в клітину-господар. Приклади векторів включають плазмідні, вірусні вектори, космідні або фагові вектори і експресуючі вектори "голої" ДНК або РНК. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-господарі, у яку їх вводять. Деякі вектори здатні до інтеграції в геном клітини-господаря при введенні в клітину-господар і, таким чином, проходять реплікацію разом з геномом господаря. Деякі вектори здатні направляти експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані, і внаслідок цього їх можна назвати "векторами експресії".

У даній заявці двадцять загальноприйнятих амінокислот і їх скорочені найменування використовуються загальноприйнятим чином.

У даному винаході запропоновано виділене антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) згідно SEQ ID NO: 100 і варіабельну область важкого ланцюга (VH), який містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR), HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і в деяких випадках, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VL згідно SEQ ID NO: 100.

SEQ ID NO: 100:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVGAAVAWYQQKPGKAPK
LLIYWASTRHTGVPX₁₁RFSGX₁₂GSQDFTLTISLQPEDFATYYCQYINYLTFGG GTKVEIKR; де
X₁₁ являє собою D або S; і
X₁₂ являє собою G або S.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 152, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 152.

SEQ ID NO: 152:

QVQLVQSGAEX₁KKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWX₂GGIYPNX₃GGSTY
NQNFKDRX₄TX₅TX₆DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARX₇GYHGPHLDFDVWGQGTTVTVSS; де
X₁ являє собою V або L;
X₂ являє собою M або I;
X₃ являє собою N, Q, A або E;
X₄ являє собою V або A;
X₅ являє собою I або L;
X₆ являє собою A або V; і
X₇ являє собою M, L або I.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 99, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 99.

SEQ ID NO: 99:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWX7GGIYPNNGGSTYN
QNFKDRX8TX9TX10DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGGQTTVTVSS; де

- Х₇ являє собою I або M;
Х₈ являє собою A або V;
5 Х₉ являє собою L або I; i
Х₁₀ являє собою V або A.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VL згідно SEQ ID NO: 100 і VH згідно SEQ ID NO: 152.

- 10 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR3 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 16, 144 або 145.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR2 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 15, 141, 142 або 143.

- 15 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR1 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 14.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить

- а) VL амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 67 або 68; i
20 VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 69, 70, 71, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 146, 147 або 148, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків VH 11, 55 або 99; або

- b) VL і VH амінокислотні послідовності, що містять
25 i. SEQ ID NO: 67 і 69, відповідно;
ii. SEQ ID NO: 67 і 70, відповідно;
iii. SEQ ID NO: 67 і 71, відповідно;
iv. SEQ ID NO: 68 і 69, відповідно;
v. SEQ ID NO: 68 і 70, відповідно; або
vi. SEQ ID NO: 68 і 71, відповідно.

- 30 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VL і VH згідно SEQ ID NO: 67 і 119, 67 і 120, 67 і 121, 67 і 122, 67 і 123, 67 і 124, 67 і 125, 67 і 126, 67 і 127, 67 і 128, 67 і 129, 67 і 130, 67 і 131, 67 і 132, 67 і 133, 67 і 146, 67 і 147, 67 і 148, 68 і 119, 68 і 120, 68 і 121, 68 і 122, 68 і 123, 68 і 124, 68 і 125, 68 і 126, 68 і 127, 68 і 128, 68 і 129, 68 і 130, 68 і 131, 68 і 132, 68 і 133, 68 і 146, 68 і 147 або 68 і 148, відповідно.

- 35 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, антитіло являє собою агоніст CD134.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, антитіло містить заміну в Fc-області.

- 40 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, заміна включає заміну S267E/L328F, заміну E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, заміну V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S або заміну M252Y/S254T/T256E, де нумерація залишків наведена відповідно до EU Index.

- 45 Антитіла, амінокислотні послідовності важкого ланцюга, легкого ланцюга, VH або VL яких несуттєво відрізняються від таких, описаних у даній заявці, включені в об'єм даного винаходу. Несуттєві відмінності являють собою заміни 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислот у послідовності варіабельної області антитіла, які не виявляють негативної дії на властивості антитіла. Амінокислотні послідовності, по суті ідентичні послідовностям варіабельної області, розкритим у даній заявці, включені в об'єм даного винаходу. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу ідентичність послідовностей може становити
50 приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більше. Відсоток ідентичності можна визначити, наприклад, за допомогою попарного вирівнювання із застосуванням налаштувань за замовчуванням модуля AlignX програмного забезпечення Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Білкові послідовності згідно із даним винаходом можна використовувати в якості шуканої послідовності для здійснення пошуку в загальнодоступних або
55 патентних базах даних, наприклад, для виявлення споріднених послідовностей. Типові програми, які застосовують для здійснення такого пошуку, являють собою програми XBLAST або BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), або GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA), настроєні із застосуванням параметрів за замовчуванням.

- 60 Як правило, несуттєва відмінність включає одну або декілька консервативних амінокислотних заміни амінокислотою, яка має аналогічний заряд, гідрофобність або

стереохімічні характеристики, в антиген-зв'язуючому сайті або в каркасній області без негативної зміни властивостей антитіла. Консервативні заміни можуть також бути введені для поліпшення властивостей антитіла, наприклад, стабільності або афінності. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 амінокислотних заміни можуть бути введені в послідовності VH або VL.

5 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу 1, 2 або 3 заміни уводять в VH або VL антитіла, описаного в даній заявці. Типові консервативні амінокислотні заміни представлені в таблиці 1. Більш того, будь-який природний залишок у поліпептиді може також бути замінений аланіном, що було раніше описано у випадку скануючого аланіном мутагенезу (MacLennan et al (1998) Act Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasaki et al (1998) Adv. Biopsy's. 35:1-24).

10 Антитіла проти CD134, описані в даній заявці, які були модифіковані для поліпшення стабільності, селективності, перехресної реактивності, афінності, імуногенності або інших бажаних біологічних або біофізичних властивостей, включені в об'єм даного винаходу. На стабільність антитіл впливає численна кількість факторів, у тому числі (1) упакування ядра окремих доменів, що впливає на їхню внутрішню стабільність, (2) білок-білкові поверхневі взаємодії, які впливають при утворенні пар HC і LC, (3) екранування полярних і заряджених залишків, (4) мережа H-сполук між полярними і зарядженими залишками; і (5) розподіл на

15 поверхні заряджених і полярних залишків крім інших усередині- і міжмолекулярних сил (Worn et al., J. Mol. Biol., 305:989-1010, 2001). Потенційні залишки, що дестабілізують структуру, можна виявити, опираючись на кристалічну структуру антитіла, і вплив залишків на стабільність

20 антитіла можна вивчити шляхом одержання і оцінки варіантів, що містять мутації виявлених залишків.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях залишків 11, 55 або 99 VH.

25 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях залишків VH являють собою V11L, N55Q, N55A, N55E, M99L або M99I.

Заміни в лінійних положеннях залишків 11, 55 або 99 VH можуть поліпшити стабільність антитіла і/або підсилити його агоністичну активність.

30 Амінокислотні заміни можуть бути введені, наприклад, шляхом ПЛР-мутагенезу (патент США №4,683,195). Бібліотеки варіантів можуть бути отримані із застосуванням добре відомих способів, наприклад, із застосуванням випадкових (NNK) або не випадкових кодонів, наприклад, кодонів DVK, які кодують 11 амінокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp), і скринінга бібліотек для виявлення варіантів з бажаними властивостями.

35 Хоча варіанти реалізації, що проілюстровані в прикладах, включають пари варіабельних областей, одна з важкого ланцюга і одна з легкого ланцюга, фахівець у даній області техніки розуміє, що альтернативні варіанти реалізації можуть містити окремі варіабельні області важкого або легкого ланцюга. Окрему варіабельну область можна застосовувати для проведення скринінга для виявлення варіабельних доменів, здатних утворювати дводомений

40 специфічний антиген-зв'язуючий фрагмент, здатний, наприклад, зв'язуватися з CD134 людини, яка має послідовність SEQ ID NO: 1. Скринінг можна проводити методами скринінга на основі фагового дисплея із застосуванням, наприклад, багаторівневого подвійного комбінаторного підходу, розкритого в міжнародній публікації патенту № WO1992/01047. У даному підході індивідуальну колонію, що містить клон H- або L-ланцюги, застосовують для інфікування повної

45 бібліотеки клонів, що кодують інший ланцюг (L або H), і отриманий у результаті дволанцюговий специфічний антиген-зв'язуючий домен вибирають відповідно до методик фагового дисплея, як було описано. Внаслідок цього індивідуальні поліпептидні ланцюги VH і VL є придатними для виявлення додаткових антитіл, що специфічно зв'язуються з CD134 людини, яка має послідовність SEQ ID NO: 1, із застосуванням способів, описаних у міжнародній публікації

50 патенту № WO1992/01047.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 згідно

- a. SEQ ID NO: 14, 15 і 144, відповідно;
- b. SEQ ID NO: 14, 15 і 145, відповідно;
- 55 c. SEQ ID NO: 14, 141, і16, відповідно;
- d. SEQ ID NO: 14, 141 і144, відповідно;
- e. SEQ ID NO: 14, 141 і 145, відповідно;
- f. SEQ ID NO: 14, 142 і 16, відповідно;
- g. SEQ ID NO: 14, 142 і 144, відповідно;
- 60 h. SEQ ID NO: 14, 142 і145, відповідно.

- i. SEQ ID NO: 14, 143 і 16, відповідно;
- j. SEQ ID NO: 14, 143 і 144, відповідно; або
- k. SEQ ID NO: 14, 143 і 145, відповідно.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, антитіла, що містять певні послідовності CDR важкого ланцюга і легкого ланцюга, описані в даній заявці, являють собою гуманізовані, людські антитіла або антитіла Deimmunized™ (деімунізовані).

Людські антитіла або антитіла Deimmunized™ можуть бути отримані, як описано в даній заявці. Гуманізовані антитіла, як правило, відносяться до антитіла, у якому сайт зв'язування з антигеном отриманий від виду, відмінного від людини, а каркасні області варіабельної області отримані від послідовностей імуноглобуліну людини. Гуманізовані антитіла можуть містити заміни в каркасних областях, внаслідок чого каркасна область може не бути точною копією експресованого імуноглобуліну людини або послідовностей гену зародкової лінії. Гуманізовані антитіла проти CD134 можуть бути отримані, наприклад, у мишах Balb/c із застосуванням стандартних способів. Антитіла, отримані в мишах Balb/c або інших тварин, відмінних від людини, можна гуманізувати із застосуванням різних методик для одержання послідовностей, більш близьких до послідовностей людини. Типові методики гуманізації, у тому числі відбір акцепторних каркасних областей людини, відомі фахівцям у даній області техніки і включають трансплантацію CDR (патент США № 5,225,539), трансплантацію SDR (патент США № 6,818,749), зміну поверхні (Palin, Mol Immunol 28:489-499, 1991), зміну поверхні залишків, що визначають специфічність (публікація патенту США № 2010/0261620), адаптацію до людини (або адаптацію до каркасної області людини) (публікація патенту США № US2009/0118127), супер-гуманізацію (патент США № 7,709, 226) і направлену селекцію (Osborn et al., Methods 36:61-68, 2005; патент США № 5,565,332).

Гуманізовані антитіла можна додатково оптимізувати для поліпшення селективності або афінності даних антитіл відносно бажаного антигену шляхом вбудовування змінених підтримуючих залишків каркасної області для збереження афінності зв'язування (зворотні мутації) із застосуванням методик, таких як методики, що розкриті і описані в міжнародній публікації патенту № WO1990/007861 і в міжнародній публікації патенту № WO1992/22653.

Імуноефекторні властивості антитіла згідно із даним винаходом можна модулювати шляхом модифікацій Fc за допомогою методик, відомих фахівцям у даній області техніки. Наприклад, ефекторні функції Fc, такі як зв'язування C1q, комплемент-залежна цитотоксичність (CDC, complement dependent cytotoxicity), антитіло-залежна клітково-опосередкована цитотоксичність (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity), фагоцитоз знижуюча регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора; BCR) і т.д., можна модулювати шляхом модифікації залишків в Fc, відповідальних за дані активності, за допомогою зв'язування з активуючими Fc-гама рецепторами (FcγR) FcγRI, FcγRIIa або FcγRIII, або з інгібуючим рецептором FcγRIIb. Фармакокінетичні властивості можна також підсилити шляхом мутагенезу залишків Fc-домену, направленою на збільшення періоду напівжиття антитіла шляхом модулювання Fc-зв'язуючої афінності з неонатальним Fc-рецептором FcRn. Типові модифікації Fc являють собою S228P/L234A/L235A IgG4, M252Y/S254T/T256E IgG2 (Dall'Acqua et al., J Biol Chem 281:23514-24, 2006); або V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 або V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S IgG2 (міжнародна публікація патенту № WO2011/066501) або модифікації, описані в патенті США № 6,737,056 (нумерація залишків відповідно до EU Index). Fc-афінність антитіла щодо інгібіторного FcγRIIb можна збільшити для підсилення перехресного зв'язування антитіла і агоністичних сигналів. Типові модифікації Fc, які підсилюють Fc-зв'язування з FcγRIIb, являють собою S267E/L328F і E233D/G237D/H268D/P271G/A330R (нумерація залишків відповідно до EU Index).

Інший варіант реалізації даного винаходу являє собою виділене антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) згідно SEQ ID NO: 98 і варіабельну область важкого ланцюга (VH), який містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VL SEQ ID NO: 98.

SEQ ID NO: 98:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX₅KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGS
GSGTDYTLTISSLQPEDFATYX₆CQQGNTLPWTFGGQGTKVEIKR,

де X₅ являє собою V або P; і

X₆ являє собою F або Y.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 134, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 134.

SEQ ID NO: 134

QVQLVQSGAEX₁KKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWX₂GYINPYNX₃GTKYN
EKFKGRX₄TX₅TSDX₆SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSX₇DYWGQGLTLTVSS;

де

- 5 X1 являє собою V або L;
X2 являє собою M або I;
X3 являє собою D, G, A, S або E;
X4 являє собою V або A;
X5 являє собою L або I;
10 X6 являє собою T або K; i
X7 являє собою M, L або I

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 97, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 97.

15 SEQ ID NO: 97:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWX₁GYINPYNDGTYKNE
KFKGRX₂TX₃TSDX₄SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGLTLTVSS;

де

- 20 X₁ являє собою I або M;
X₂ являє собою A або V;
X₃ являє собою L або I; i
X₄ являє собою K або T.

Згідно з деяким варіантом реалізації даного винаходу, описаним в даній заявці, виділене антитіло містить VL згідно SEQ ID NO: 99 і VH згідно SEQ ID NO: 134.

- 25 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR3 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 8, 139 або 140.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR2 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 або 138.

- 30 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить HCDR1 амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 6.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить

- 35 a. VL амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 62 або 63; і
VH амінокислотну послідовність, що містить, SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 або 151, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків VH11, 56 або 106; або

- 40 b. VL і VH, що містить амінокислотні послідовності згідно
i. SEQ ID NO: 62 і 64, відповідно;
ii. SEQ ID NO: 62 і 65, відповідно;
iii. SEQ ID NO: 62 і 66, відповідно;
iv. SEQ ID NO: 63 і 64, відповідно;
v. SEQ ID NO: 63 і 65, відповідно; або
45 vi. SEQ ID NO: 63 і 66, відповідно.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить VL і VH згідно SEQ ID NO: 62 і 64, 62 і 65, 62 і 66, 62 і 101, 62 і 102, 62 і 103, 62 і 104, 62 і 105, 62 і 106, 62 і 107, 62 і 108, 62 і 109, 62 і 110, 62 і 111, 62 і 112, 62 і 113, 62 і 114, 62 і 115, 62 і 116, 62 і 117, 62 і 118, 62 і 149, 62 і 150, 62 і 151. 63 і 64, 63 і 65, 63 і 66, 63 і 101, 63 і 102, 63 і 103, 63 і 104, 63 і 105, 63 і 106, 63 і 107, 63 і 108, 63 і 109, 63 і 110, 63 і 111, 63 і 112, 63 і 113, 63 і 114, 63 і 115, 63 і 116, 63 і 117, 63 і 118, 63 і 149, 63 і 150, 63 і 151.

- 50 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, виділене антитіло містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях залишків VH 11, 56 або 106.

- 55 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу, описаними у даній заявці, 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях залишків VH являють собою V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L або M106I.

1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях залишків 11, 55 або 99 VH можуть поліпшувати стабільність антитіла і/або підсилювати його агоністичну активність.

- 60 У даному винаході запропонована зв'язуюча молекула, яка містить

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 (SEQ ID NO: 99) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

5 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 (SEQ ID NO: 100) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула, яка містить

10 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 26 (SEQ ID NO: 97) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

(b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 26 (SEQ ID NO: 98) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

15 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула зв'язується з CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L).

20 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується на не більше ніж 50 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини, при концентрації, у якій зв'язування із зазначеною молекулою CD134 є насиченим, або при концентрації, що перевищує зазначену концентрацію.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу при концентрації зв'язуючої молекули 70 нМ ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується на не більше ніж 70 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини.

25 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 і/або SEQ ID NO: 92.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою Fab-фрагмент, однопептидний Fv (scFv)-фрагмент або антитіло.

30 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіло являє собою антитіло IgG, IgA, IgD, IgE або IgM, таке як антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіло являє собою антитіло IgG1 або IgG4.

35 У даному винаході також запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує зв'язуючу молекулу або антитіло згідно із даним винаходом. Також запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, важкий ланцюг, варіабельну область легкого ланцюга або легкий ланцюг гуманізованого антитіла згідно із даним винаходом. Типові гуманізовані антитіла являють собою гуманізоване антитіло 12H3 або гуманізоване антитіло 20E5 згідно із даним винаходом.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти кодує

40 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 (SEQ ID NO: 99) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

(b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 (SEQ ID NO: 100) або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

45 Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти кодує варіабельну область гуманізованого антитіла батьківського антитіла 12H3 миші. Варіабельну область вибирають із варіабельних областей антитіла 12H3_VL1VH1; 12H3_VL1VH2; 12H3_VL1VH3; 12H3_VL2VH1; 12H3_VL2VH2; або 12H3_VL2VH3. Амінокислотні послідовності типових варіабельних областей представлені в SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 і 71.

50 Згідно з іншим варіантом реалізації в даному винаході запропонована молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3, представлену в SEQ ID NO: 69, 70 і 71. Згідно з іншим варіантом реалізації в даному винаході запропонована молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3, представлену в SEQ ID NO: 67 і 68.

55 Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти кодує варіабельну область гуманізованого антитіла батьківського антитіла миші 20E5. Типові варіабельні області являють собою варіабельні області антитіла 20E5_VL1VH1; 20E5_VL1VH2; 20E5_VL1VH3; 20E5_VL2VH1; 20E5_VL2VH2; і 20E5_VL2VH3. Амінокислотні послідовності типових варіабельних областей представлені в SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 і 66.

60

Послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 78, кодує амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 88. Нуклеїнові кислоти 58 – 420 з SEQ ID NO: 78 кодують амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 70.

5 Послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 79, кодує амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 89. Нуклеїнові кислоти 58 – 420 з SEQ ID NO: 79 кодують амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 71.

Послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 80, кодує амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 90. Нуклеїнові кислоти 67 – 390 з SEQ ID NO: 80 кодують амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 67.

10 Послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 81, кодує амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 91. Нуклеїнові кислоти 67 – 390 з SEQ ID NO: 81 кодують амінокислотну послідовність, представлена в SEQ ID NO: 68.

У деяких варіантах реалізації даного винаходу запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 і/або SEQ ID NO: 81. Згідно із переважним варіантом реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність без послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує сигнальний пептид. Це пояснюється тим, що можна застосовувати численну кількість різних сигнальних пептидів. Таким чином, у даному винаході запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO: 20 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 і/або SEQ ID NO: 81, у якій послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує сигнальний пептид, відсутня або замінена послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує різні сигнальні пептиди, що підходять для направленої екскреції кодуючого поліпептиду.

25 Згідно з деякими варіантами реалізації в даному винаході запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що містить

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 414 з SEQ ID NO: 72;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 414 з SEQ ID NO: 73;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 414 з SEQ ID NO: 74;

30 залишки нуклеїнової кислоти 58 – 381 з SEQ ID NO: 75;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 381 з SEQ ID NO: 76;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 420 з SEQ ID NO: 77;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 420 з SEQ ID NO: 78;

залишки нуклеїнової кислоти 58 – 420 з SEQ ID NO: 79;

35 залишки нуклеїнової кислоти 67 – 390 з SEQ ID NO: 80; або

залишки нуклеїнової кислоти 67 – 390 з SEQ ID NO: 81

Згідно з деякими варіантами реалізації в даному винаході запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101-133 або 146-148.

40 У даному винаході також запропонований носій або вектор для доставки генів, що містить нуклеїнову кислоту згідно із даним винаходом.

Також запропонована виділена або рекомбінантна клітина або культура клітин *in vitro*, що містить нуклеїнову кислоту або вектор згідно із даним винаходом. Клітина переважно являє собою клітину-господаря, як визначено в даній заявці. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу клітина являє собою клітину, широко використовувану для одержання антитіл, таку як клітина CHO, клітина CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), клітина CHO-K1 (ATCC CRL-61), клітина NSO (Європейська колекція клітинних культур, European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wilthshire, UK, ECACC N. 85110503), клітина SP2/0 (Американська колекція типових культур, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), клітина HEK 293-F, клітина PER.C6, клітина FO (ATCC CRL-1646), клітина Ag653 (ATCC CRL-1580) або гібридома. Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу клітина являє собою клітину комахи.

У даному винаході також запропоновано спосіб одержання зв'язуючої молекули, який відрізняється тим, що в його результаті одержують зв'язуючу молекулу згідно з даною формулою винаходу або антитіло згідно з даною формулою винаходу. Отримане антитіло виділяють із клітинної культури, супернатанту/середовища клітинної культури або їх комбінації. Виділене антитіло очищують і впаковують у контейнер, переважно контейнер для зберігання або транспортування.

У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула або антитіло згідно із даним винаходом для застосування при лікуванні індивідуума, який потребує підсилення імунної відповіді.

5 Також запропонована зв'язуюча молекула або антитіло згідно із даним винаходом для застосування в запобіганні або лікуванні раку в індивідуума, який потребує такого запобігання або лікування.

Також запропонована зв'язуюча молекула або антитіло згідно із даним винаходом для застосування при лікуванні індивідуума, що страждає від або підданого ризику розвитку хронічної вірусної і/або внутрішньоклітинної бактеріальної інфекції.

10 У даному винаході також запропонована фармацевтична композиція, що містить зв'язуючу молекулу або антитіло згідно із даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

У даному винаході запропоновані виділені зв'язуючі молекули, які зв'язуються з CD134 людини, у тому числі антитіла проти CD134, антиген-зв'язуючі фрагменти антитіл проти CD134 і похідні антитіл проти CD134. Зв'язуючі молекули характеризуються щонайменше одним з наступних функціональних властивостей: (a) зв'язуються з CD134 людини з K_d , що становить 1×10^{-6} М або менше, і (b) не запобігають зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L); (c) мають агоністичну активність щодо CD134 людини на Т-ефекторних клітинах і/або антагоністичну активність щодо CD134 людини на Т-регуляторних клітинах; (d) не зв'язуються з рецептором CD40 у концентрації більше 500 нМ; (e) не зв'язуються з рецептором CD137 у концентраціях більше 500 нМ; (f) не зв'язуються з рецептором CD271 у концентраціях більше 500 нМ; (g) здатні підсилювати продукцію ІЛ-2 виділеними Т-клітинами людини; (h) здатні підсилювати імунну відповідь; (i) здатні інгібувати ріст пухлинних клітин; і (j) мають терапевтичний ефект відносно раку. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула зв'язується з CD134 людини з K_d , що становить 1×10^{-7} М або менше, або 1×10^{-8} М або менше, або $5 \times 1 \times 10^{-9}$ М або менше.

Антитіла і інші зв'язуючі молекули згідно із даним винаходом можуть бути отримані за допомогою загальноприйнятих методик і потім піддані скринінгу для виявлення і одержання зв'язуючих молекул, які не запобігають зв'язуванню OX40L з CD134. Наприклад, можуть бути обрані зв'язуючі молекули, які зв'язуються з CD134 навіть у випадку, коли CD134 піддають впливу насичуючій концентрації OX40L.

У деяких варіантах реалізації в даному винаході запропоновано антитіло миші, людини або гуманізоване антитіло, яке зв'язується з CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіло миші, людини або гуманізоване антитіло являє собою моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з CD134 людини з K_d , що становить 100 нМ або менше або 10 нМ або менше, і/або має агоністичну активність щодо CD134 людини, яка призводить до стимуляції Т-ефекторних клітин і/або супресії Т-регуляторних клітин. Типове зазначене антитіло являє собою клон моноклонального антитіла 12H3. Амінокислотна послідовність повної варіабельної області важкого ланцюга і амінокислотні послідовності трьох CDR варіабельної області важкого ланцюга (VH) клону антитіла 12H3 представлені в SEQ ID NO: 12 і 14-16, відповідно. Амінокислотна послідовність повної варіабельної області легкого ланцюга і амінокислотні послідовності трьох CDR варіабельної області легкого ланцюга (VL) клону антитіла 12H3 представлені в SEQ ID NO: 13 і 17-19, відповідно. Інше типове антитіло являє собою клон моноклонального антитіла 20E5. Амінокислотна послідовність повної варіабельної області важкого ланцюга і амінокислотні послідовності трьох CDR варіабельної області важкого ланцюга (VH) клону антитіла 20E5 представлені в SEQ ID NO: 4 і 6-8, відповідно. Амінокислотна послідовність повної варіабельної області легкого ланцюга і амінокислотні послідовності трьох CDR варіабельної області легкого ланцюга (VL) клону антитіла 20E5 представлені в SEQ ID NO: 5 і 9-11, відповідно. Інші типові антитіла являють собою гуманізовані антитіла 12H3_VL1VH1, 12H3_VL1VH2, 12H3_VL1VH3, 12H3_VL2VH1, 12H3_VL2VH2, 12H3_VL2VH3 і гуманізовані антитіла 20E5_VL1VH1, 20E5_VL1VH2, 20E5_VL1VH3, 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2, 20E5_VL2VH3, а також оптимізовані варіанти даних антитіл, що містять варіабельні області важкого ланцюга, описані в прикладі 14. Дані антитіла містять послідовності варіабельної області SEQ ID NO: 67 (12H3_VL1), SEQ ID NO: 68 (12H3_VL2), SEQ ID NO: 69 (12H3_VH1), SEQ ID NO: 70 (12H3_VH2), SEQ ID NO: 71 (12H3_VH3), SEQ ID NO: 62 (20E5_VL1), SEQ ID NO: 63 (20E5_VL2), SEQ ID NO: 64 (20E5_VH1), SEQ ID NO: 65 (20E5_VH2), SEQ ID NO: 66 (20E5_VH3) і варіабельні області, представлені в таблицях 6 і 9, що мають амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 101-133 і 146-151.

У даному винаході також запропоновані антитіла, що містять гуманізовану варіабельну область, яка обрана з гуманізованих варіабельних областей антитіл 12H3_VL1VH1; 12H3_VL1VH2; 12H3_VL1VH3; 12H3_VL2VH1; 12H3_VL2VH2; 12H3_VL2VH3; 20E5_VL1VH1;

20E5_VL1VH2; 20E5_VL1VH3; 20E5_VL2VH1; 20E5_VL2VH2; або 20E_VL2VH3 (як зазначено в попередньому абзаці і у прикладах), або варіабельну область важкого ланцюга згідно SEQ ID NO: 101-133 і 146-151.

5 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 90 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 87 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

10 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 90 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 88 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

15 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 90 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 89 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 91 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 87 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

20 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 91 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 88 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

25 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 12H3, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 91 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARС") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 89 (за винятком сигнальної послідовності "MELGLSWIFLLAILKGVQC").

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 85 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 82 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

30 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 85 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 83 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

35 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 85 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 84 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

40 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 86 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 82 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

45 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 86 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 83 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу гуманізоване антитіло являє собою гуманізоване антитіло 20E5, що містить легкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 86 (за винятком N-термінальної сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS") і важкий ланцюг згідно SEQ ID NO: 84 (за винятком сигнальної послідовності "MEWSGVFMFLLSVTAGVHS").

50 Антитіла згідно із даним винаходом можуть містити одну або декілька з даних CDR або одну або декілька з даних CDR з 1, 2 або 3 амінокислотними замінами в кожній CDR. Заміни можуть бути "консервативними" замінами. Консервативні заміни, що забезпечують одержання функціонально аналогічних амінокислот, добре відомі в даній області техніки і описані, наприклад, у таблиці 1 WO 2010/019702, яка включена в дану заявку за допомогою посилання. Типові консервативні заміни представлені в таблиці 1. Амінокислоти позначені із застосуванням широко відомого трибуквеного коду.

60

Таблиця 1

Вихідна амінокислота	Типова консервативна заміна
Ala	Val, Ile, Leu, Gly, Ser
Arg	Lys, His, Glu, Asn
Asn	Glu, His, Lys, Arg
Asp	Glu, Asn
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp, Glu
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Nle
Leu	Nle, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Glu, Asn, His
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala, Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, leu, Phe, Ala, Nle

3 врахуванням того, що клон 12H3 і клон 20E5 зв'язуються з CD134 людини, послідовності VH і VL кожного з них можуть бути "змішані і сполучені" з іншими антитілами проти CD134 для одержання додаткових антитіл. Зв'язування таких "змішаних і сполучених" антитіл з CD134 людини можна вивчити із застосуванням аналізів зв'язування, відомих у даній області техніки, у тому числі аналізів, описаних у прикладах. В одному випадку, коли області VH і VL змішані і сполучені, послідовність VH, утворену в результаті конкретного спарювання VH/VL, замінюють подібною в структурному відношенні послідовністю VH. Аналогічно, в іншому випадку послідовність VL, утворену в результаті певного спарювання VH/VL, замінюють послідовністю VL, подібною в структурному відношенні.

Молекули, що містять тільки одну або дві області CDR (у деяких випадках, навіть тільки одну CDR або її частину, особливо CDR3), здатні підтримувати антиген-зв'язуючу активність антитіла, з якого була отримана (були отримані) CDR. Див., наприклад, Laune et al. JBC 1997; 272: 30937-44; Monnet et al. JBC 1999; 274:3789-96; Qiu et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 921-9; Ladner et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 875-7; Heap et al. J Gen Virol 2005; 86: 1791-1800; Nicaise et al. Protein Science 2004; 13: 1882-91; Vaughan and Sollazzo Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2001; 4:417-430; Quiococho Nature 1993; 362: 293-4; Pessi et al. Nature 1993; 362: 367-9; Bianchi et al. J Mol Biol 1994; 236: 649-59; i Gao et al. J Biol Chem 1994; 269: 32389-93.

Відповідно, один варіант реалізації даного винаходу являє собою виділене антитіло проти CD134 людини, яке містить: (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12; (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13.

Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу запропонована виділена молекула, що зв'язує CD134, яка містить: (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; і/або (b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; і/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16.

Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу запропонована виділена молекула, що зв'язує CD134, яка містить (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; і/або (b) CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19.

Відповідно, один варіант реалізації даного винаходу являє собою виділене антитіло проти CD134 людини, яке містить: (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5.

5 Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу запропонована виділена молекула, що зв'язує CD134, яка містить: (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6; і/або (b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7; і/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.

10 Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу запропонована виділена молекула, що зв'язує CD134, яка містить (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9; і/або (b) CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; і/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.

15 Зважаючи на те, що клон 12H3 і клон 20E5 зв'язуються з CD134 людини і що антиген-зв'язуюча специфічність забезпечується в першу чергу областями CDR1, CDR2 і CDR3, послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL можна "змішувати і сполучати" для створення додаткових антитіл проти CD134. Наприклад, CDR з різних антитіл проти CD134 можна змішувати і сполучати, хоча кожне антитіло буде, як правило, містити CDR1, CDR2 і CDR3 VH і CDR1, CDR2 і CDR3 VL. Зв'язування таких "змішаних і сполучених" антитіл з CD134 можна вивчити із застосуванням аналізів зв'язування, описаних вище або в прикладах (наприклад, аналізи ELISA, Biacore). В одному випадку, коли змішують і сполучають послідовності CDR VH, послідовність CDR1, CDR2 і/або CDR3 з конкретної послідовності VH замінюють послідовністю (послідовностями) CDR, подібними в структурному відношенні. Аналогічно, коли змішують і сполучають послідовності CDR VL, послідовність CDR1, CDR2 і/або CDR3 з конкретної послідовності VL, як правило, замінюють послідовністю (послідовностями) CDR, подібними в структурному відношенні. Середньому фахівцеві в даній області техніки очевидно, що нові послідовності VH і VL можуть бути створені в результаті заміни однієї або декількох послідовностей областей CDR VH і/або VL структурно подібними послідовностями з послідовностей CDR, розкритих у даній заявці.

30 Клас (наприклад, IgG, IgM, IgE, IgA або IgD) і підклас (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4) антитіл проти CD134 можна визначити будь-яким підходящим способом, таким як ELISA або вестерн-блотинг, а також іншими методиками. В якості альтернативи, клас і підклас можна визначити шляхом секвенування всіх або частини константних доменів важкого і/або легкого ланцюгів антитіла, порівняння їх амінокислотних послідовностей з відомими амінокислотними послідовностями різних класів і підкласів імуноглобулінів і визначення класу і підкласу антитіла. Антитіла проти CD134 можуть являти собою молекулу IgG, IgM, IgE, IgA або IgD. Наприклад, антитіла проти CD134 можуть являти собою IgG, який відноситься до підкласу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Таким чином, в іншому аспекті даного винаходу запропоновано спосіб зміни класу або підкласу антитіла проти CD134 на інший клас або підклас.

40 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіло проти CD134 відноситься до ізотипу IgG4. Зв'язуючі молекули згідно з варіантом реалізації даного винаходу включають моноклональні антитіла, їх фрагменти, пептиди і інші хімічні угруповання. Моноклональні антитіла можуть бути отримані загальноприйнятими способами імунізації ссавця з наступним виділенням із плазми В-клітин, продукуючих моноклональні антитіла, що представляють інтерес, і злиття із клітиною мієломи.

45 Згідно з різними варіантами реалізації даного винаходу замість фактичного антитіла група зв'язування може являти собою міметик антитіла (наприклад, на основі кістяка, відмінного від кістяка антитіла), аптамер РНК, малу молекулу або CovX-Body.

50 Слід приймати до уваги, що міметики антитіл (наприклад, структури на основі кістяка, відмінного від кістяка антитіла, які характеризуються високим ступенем стабільності і при цьому забезпечують варіабельність у певних положеннях) можна застосовувати для створення молекулярної бібліотеки, з якої можна одержати групи зв'язування. Фахівець в області біохімії добре знайомий з багатьма такими молекулами. Такі молекули можна застосовувати в якості групи зв'язування в засобі згідно із даним винаходом.

55 Типові міметики антитіл обговорюються в публікації Skerra et al. (2007, Curr. Opin. Biotech., 18: 295-304) і включають: афітіла (також називані тринектинами; Nygren et al., 2008, FEBS J, 275, 2668-2676); CTLD (C-type lectin-like domain, лектинові домени C-типу, також називані тетранектинами; Thøgersen et al., Innovations Pharmac. Technol. (2006), 27-30); аднектини (також називані монотілами; Koide et al., Meth. Mol. Biol., 352 (2007), 95-109); антикаліни (Schlehuber et al., Drug Discovery Today (2005), 10, 23-33); DARPIn (designed ankyrin repeat proteins, сконструйовані білки на основі анкіринових повторів, анкірини; Binz et al., Nat. Biotechnol. (2004),

22, 575-582); авімери (Silverman et al., *Nat. Biotechnol.* (2005), 23, 1556-1561); мікротіла (Krause et al., *FEBS J.* (2007), 274, 86-95); пептидні аптамери (Borghouts et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005), 5, 783-797); домени Кунітца (Attucci et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2006) 318, 803-809); афіліни (Hey et al., *Trends. Biotechnol.* (2005), 23, 514-522).

5 Відповідно, переважно, що міметик антитіла вибирають із групи, що складається з або, що включає афітіла, тетранектини (CTLD), аднектини (монотіла), антикаліни, DARPin (анкірини), авімери, iMab, мікротіла, пептидні аптамери, домени Кунітца, аптамери і афіліни.

10 Під "малою молекулою" розуміють низькомолекулярну органічну сполуку з молекулярною масою 900 Дальтон або менше. Хоча більші біополімери, такі як нуклеїнові кислоти, білки і полісахариди (такі як крохмаль або целюлоза) не відносяться до "малих молекул" мономери, що входять до їхнього складу (рибо- або дезоксирибонуклеотиди, амінокислоти і моносахариди, відповідно) і олігомери (тобто короткі полімери, такі як динуклеотиди, пептиди, такі як антиоксидант глутатин, і дисахариди, такі як сахароза) включені в даний термін. Одержання малих молекул описане в публікаціях Mayes & Whitcombe, 2005, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1742-78 і Root-Bernstein & Dillon, 2008, *Curr. Pharm. Des.* 14:55-62.

15 CovX-Body одержують шляхом ковалентного приєднання фармакофору через лінкер до сайту зв'язування спеціально розробленого антитіла, що забезпечує ефективне перепрограмування антитіла (Tryder et al., 2007, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17:501-6). Результатом даного процесу є новий клас хімічних угруповань, який утворюється, коли кожен компонент вносить бажані властивості в інтактне CovX-Body, – зокрема, отримане угруповання має біологічні дії пептиду і збільшений період напівжиття антитіла.

20 Антитіла людини можна одержати декількома різними способами, у тому числі із застосуванням експресійних бібліотек імуноглобуліну людини (Stratagene Corp., La Jolla, California; Cambridge Antibody Technology Ltd., London, England) для одержання фрагментів антитіла людини (VH, VL, Fv, Fd, Fab або (Fab')₂), і із застосуванням даних фрагментів для конструювання повного антитіла людини шляхом злиття з даними фрагментами відповідної частини із застосуванням методик, подібних методик одержання химерного антитіла. Наприклад, антитіла людини можна виділити з бібліотек фагового дисплея, експресуючих варіабельні області важкого і легкого ланцюга антитіла у вигляді злитих білків з білком оболонки бактеріофага pIX, як описано в публікації Shi et al (2010) *J. Mol. Biol.* 397:385-96 і міжнародній публікації PCT № WO09/085462). Антитіла людини також можна одержати в трансгенних мишах з геномом імуноглобуліну людини. Такі миші доступні, наприклад, від Abgenix, Inc., Fremont, Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), Kymab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) і Ablexis (http://_www_ablexis.com). Крім приєднання Fv-областей важкого і легкого ланцюгів для утворення одноланцюгового пептиду, можна конструювати Fab і експресувати його подібними способами (M.J. Evans et al. *J Immunol Meth* 1995; 184: 123-138).

40 Антитіла Delmimized™ являють собою антитіла, у яких потенційно імуногенні епітопи Т-клітин були вилучені, як описано в міжнародній заявці на патент PCT/GB98/01473. Внаслідок цього, очікується, що імуногенність даних антитіл у людині буде усунута або по суті зменшена при застосуванні *in vivo*. Зв'язуючі молекули на основі імуноглобуліну згідно із даним винаходом можуть містити імуногенні епітопи Т-клітин (у випадку наявності), які видаляють за допомогою таких способів.

45 Усі з повністю або частково людських антитіл, описаних вище, є менш імуногенними, ніж повністю мишачі антитіла або антитіла, отримані не від людини, у вигляді фрагментів і одноланцюгових антитіл. Внаслідок цього всі дані молекули (або їхні похідні) менш імовірно викличуть імунну або алергічну відповідь. Отже, такі молекули є більш підходящими для введення людині *in vivo*, ніж антитіла, що повністю відмінні від антитіл людини, особливо, коли необхідно періодичне або тривале введення.

50 Біспецифічні антитіла можна застосовувати в якості засобів, що утворюють поперечні зв'язки між CD134 людини однієї і тій же цільової клітини людини або між CD134 людини на двох різних цільових клітинах людини. Такі біспецифічні антитіла мають специфічність до кожного із двох різних епітопів на CD134 людини. Дані антитіла і спосіб їх одержання описані в патенті США № 5,534,254 (Creative Biomolecules, Inc.). Різні варіанти реалізації біспецифічних антитіл, описані в патентах, включають об'єднання одноланцюгового Fv з пептидними лінкерами, у тому числі Ser-Cys, (Gly)₄-Cys, (His)₆-(Gly)₄-Cys, хелатуючими засобами і хімічними або дисульфідними зв'язуючими речовинами, у тому числі бісмалеїмідогексаном і бісмалеїмідокапроїлом.

Області VL і/або VH антитіл згідно із даним винаходом можна сконструювати в інші варіанти реалізації біспецифічних повнорозмірних антитіл, де кожне плече антитіла зв'язується з окремим антигеном або епітопом. Такі біспецифічні антитіла можуть бути отримані, наприклад, шляхом модулювання СН3-взаємодій між важкими ланцюгами двох антитіл з утворенням біспецифічних антитіл із застосуванням методик, таких як методики, що описані в патенті США № 7,695,936; міжнародній публікації патенту № WO2004/111233; публікації патенту США № US2010/0015133; публікації патенту США № US2007/0287170; міжнародній публікації патенту № WO2008/119353; публікації патенту США № US2009/0182127; публікації патенту США № US2010/0286374; публікації патенту США № US2011/0123532; міжнародній публікації патенту № WO2011/131746; міжнародній публікації патенту № WO2011/143545; або публікації патенту США № US2012/0149876. Додаткові біспецифічні структури, у які можуть бути вбудовані області VL і/або VH антитіл згідно із даним винаходом, являють собою, наприклад, імуноглобуліни з подвійним варіабельним доменом (міжнародна публікація патенту № WO2009/134776) або структури, які містять різні домени димеризації для сполуки двох плечей антитіла з різною специфічністю, такі як лейцинова блискавка або домени димеризації колагену (міжнародна публікація патенту № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441).

Молекули, відмінні від антитіл, можна виділити або піддати скринінгу з бібліотеки сполук загальноприйнятими способами. Автоматизована система для створення і скринінга бібліотеки сполук описана в патентах США №№ 5,901,069 і 5,463,564. Більш сфокусований підхід включає тривимірне моделювання сайту зв'язування, а потім одержання сімейства молекул, відповідних до моделі. Дані молекули потім піддають скринінгу для пошуку молекул з оптимальними характеристиками зв'язування.

Інший підхід полягає в створенні бібліотек рекомбінантних пептидів з наступним скринінгом даних бібліотек для виявлення пептидів, які зв'язуються з епітопом CD134 людини, що представляють інтерес. Див., наприклад, патент США № 5,723,322. Даний епітоп є таким самим, як епітоп, з яким зв'язуються моноклональні антитіла, що описані в прикладах нижче. Молекули можуть бути отримані або виділені порівняно легко відповідно до методик, добре відомих у даній області техніки, якщо такий епітоп відомий.

У наступному варіанті реалізації даного винаходу запропоновані похідні будь-яких антитіл проти CD134, описаних вище. Відповідно одному конкретному аспекту даного винаходу похідну антитіла одержують у результаті модифікацій амінокислотних послідовностей клону 12H3 і/або клону 20E5. Можна модифікувати амінокислотні послідовності будь-яких областей ланцюга антитіла, таких як каркасні області, області CDR або константні області. Модифікації можуть бути введені за допомогою стандартних методик, відомих у даній області техніки, таких як сайт-направлений мутагенез і випадковий ПЛР-опосередкований мутагенез, і можуть включати природні, а також неприродні амінокислоти. Типи модифікацій включають вставки, делеції, заміни або комбінації зазначених модифікацій однієї або декількох амінокислот антитіла проти CD134. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу похідна антитіла містить 1, 2, 3, або 4 амінокислотні заміни в CDR важкого ланцюга і/або одну амінокислотну заміну в CDR легкого ланцюга. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу похідна антитіла проти CD134 містить одну або декілька амінокислотних замін щодо амінокислотної послідовності гена людини зародкової лінії. Згідно з конкретним варіантом реалізації даного винаходу одна або декілька з даних замін щодо зародкової лінії перебувають в області CDR2 важкого ланцюга. Відповідно іншому конкретному варіанту реалізації даного винаходу амінокислотні заміни щодо зародкової лінії перебувають в одному або декількох тих самих положеннях, що і заміни щодо зародкової лінії в клоні антитіла 12H3 і клоні 20E5. Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу амінокислотна заміна являє собою заміну одного або декількох цистеїнів в антитілі іншим залишком, таким як, без обмеження, аланін або серин. Цистеїн може являти собою канонічний або неканонічний цистеїн. Заміни можуть бути введені в CDR або в каркасну область варіабельного домену або в константний домен антитіла. Інший тип амінокислотної заміни являє собою видалення пар аспарагін-гліцин, які утворюють потенційні сайти деамідування, шляхом зміни одного або обох залишків. Згідно з ще одним варіантом реалізації даного винаходу амінокислотна заміна являє собою консервативну амінокислотну заміну. Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу похідна антитіла має 1, 2, 3 або 4 консервативні амінокислотні заміни в областях CDR важкого ланцюга щодо амінокислотних послідовностей клону 12H3 і/або клону 20E5. Інший тип модифікації антитіла проти CD134 являє собою зміну вихідного характеру глікозилювання антитіла. Термін "зміна" відноситься до видалення однієї або декількох вуглеводних груп присутніх в антитілі, і/або до додавання одного або декількох сайтів глікозилювання, які не присутні в антитілі.

Глікозилування антитіла є, як правило, N-зв'язаним. N-зв'язане глікозилування відноситься до приєднання вуглеводної групи до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Приклади інших модифікацій включають ацилювання, амідуювання, ацетилювання, перехресне зшивання, циклізацію, формілювання, гідроксилювання, йодування, метилювання, міристиолування, утворення дисульфідного зв'язку, деметилювання, утворення ковалентних поперечних зшивок, утворення цистеїну, окиснення, фосфорилювання, пренилювання, пегілювання, протеолі процесінг і сульфатилування.

У наступному варіанті реалізації даного винаходу запропоновано похідну антитіла, яка містить антитіло проти CD134 або антиген-зв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла, як описано в даній заявці, приєднаний до додаткового молекулярного угруповання. Приклади додаткових молекулярних угруповань включають фармацевтичні засоби, пептиди або білки, а також засоби для виявлення або мітки. Конкретні приклади фармацевтичних засобів, які можна приєднувати до антитіла проти CD134, включають цитотоксичні засоби або інші терапевтичні засоби для лікування раку, а також радіоактивні ізотопи. Конкретні приклади пептидів або білків, які можна приєднувати до антитіла проти CD134, включають антитіла, які можуть являти собою те саме антитіло проти CD134 або інше антитіло. Конкретні приклади засобів для виявлення або міток, які можна приєднувати до антитіла проти CD134, включають (1) флуоресцентні сполуки, такі як флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціонат, фікоеритрин, родамін, нафтален-сульфоніл хлорид і люмінофори на основі комплексів лантанідів; (2) ферменти, такі як пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, люцифераза і глюкозооксидаза; (3) біотин; (4) визначений поліпептидний епітоп, який розпізнається вторинною репортерною групою, такі як парні послідовності лейцинової блискавки, метал-зв'язуючі домени, епітопні мітки і сайти зв'язування вторинних антитіл. У наступному варіанті реалізації даного винаходу запропонована похідна антитіла, яка являє собою мультимерну форму антитіла проти CD134, таку як димери, тримери антитіла або мультимери мономерного антитіла більш високого порядку. Індивідуальні мономери в мультимері антитіла можуть бути ідентичними або різними, тобто мультимері антитіла можуть бути гетеромерними або гомомерними. Мультимеризацію антитіла можна здійснити шляхом природньої агрегації. Наприклад, деякий відсоток очищених препаратів антитіла (наприклад, очищених молекул IgG1) спонтанно утворює агрегати білка, що містять гомодимери антитіла, а також інші мультимери антитіла більш високого порядку. В якості альтернативи, гомодимери антитіла можуть бути утворені за допомогою методик хімічного зв'язування, відомих у даній області техніки. Підходящі зшиваючі сполуки включають сполуки, які є гетеробіфункціональними, такі як складний ефір м-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукциніміду, N-сукцинімідил S-ацетилтіо-ацетат і сукцинімідил 4-(малеїмідометил)сциклогексан-1-карбоксилат), або гомобіфункціональними (такими як дисукцинімідил суберат). Такі лінкери комедічно доступні. Також можуть бути отримані антитіла для мультимеризації за допомогою методик рекомбінантної ДНК, відомих у даній області техніки.

У наступному варіанті реалізації даного винаходу запропоновано похідну антитіла, яка являє собою химерне антитіло, що містить амінокислотну послідовність антитіла проти CD134 людини, описаного в даній заявці вище. В іншому прикладі всі з CDR химерного антитіла отримані з антитіла проти CD134 людини. В іншому прикладі в химерному антитілі поєднують CDR від більш ніж одного антитіла проти CD134 людини. Також химерне антитіло може містити каркасні області, отримані з одного антитіла проти CD134 людини, і одну або декілька CDR з одного або декількох інших антитіл людини. Химерні антитіла можуть бути отримані із застосуванням загальноприйнятих способів, відомих у даній області техніки. Відповідно деяким конкретним варіантам реалізації даного винаходу химерне антитіло містить одну, дві або три CDR з варіабельної області важкого ланцюга або з варіабельної області легкого ланцюга антитіла, обраного із клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5.

Приклади інших похідних антитіл, запропонованих у даному винаході, включають одностанцюгові антитіла, діатіла, доменні антитіла, нанотіла і унітіла. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу моноклональні антитіла можуть являти собою химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла людини, антитіла Delmimmunized™, біспецифічні антитіла, одностанцюгові антитіла, фрагменти, у тому числі Fab, F(ab')₂, Fv або інші фрагменти, які зберігають функцію зв'язування з антигеном батьківського антитіла. Одностанцюгові антитіла ("ScFv") і спосіб їх одержання описані в патенті США № 4,946,778.

"Одностанцюгове антитіло" (scFv) складається з окремого поліпептидного ланцюга, що містить домен VL, приєднаний до домену VH, де домен VL і домен VH спарені для утворення моновалентної молекули. Одностанцюгове антитіло можна одержати згідно зі способом, відомих у даній області техніки (див., наприклад, публікації Bird et al., (1988) Science 242:423-426 і Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). "Діатіло" складається із двох

ланцюгів, причому кожний ланцюг містить варіабельну область важкого ланцюга, приєднану до варіабельної області легкого ланцюга на тому самому поліпептидному ланцюзі, приєднаному коротким пептидним лінкером, де дві області на тому самому ланцюзі утворюють пари не один з одним, але з комплементарними доменами на іншому ланцюзі для утворення біспецифічної молекули. Способи одержання діатіл відомі в даній області техніки (Див., наприклад, публікації Hollger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, і Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123). Доменні антитіла (dAb) являють собою малі функціональні зв'язуючі одиниці антитіл, відповідні до варіабельних областей важкого або легкого ланцюгів антитіл. Доменні антитіла добре експресуються в клітинних системах бактерій, дріжджів і ссавців. Додаткові подробиці щодо доменних антитіл і способів їх одержання відомі в даній області техніки (див., наприклад, патенти США №№ 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; WO04/003019 і WO03/002609). Нанотіла одержують із важких ланцюгів антитіла. Нанотіло, як правило, містить один варіабельний домен і два константні домени (CH2 і CH3) і зберігає антиген-зв'язуючу здатність вихідного антитіла. Нанотіла можна одержати із застосуванням способів, відомих у даній області техніки (див., наприклад, патент США № 6,765,087, патент США № 6,838,254, WO 06/079372). Унітіла складаються з одного легкого ланцюга і одного важкого ланцюга антитіла IgG4. Унітіла можна одержати шляхом видалення шарнірної області антитіла IgG4. Додаткові подробиці відносно унітіл і способів їх одержання можна знайти в міжнародній заявці WO2007/059782.

Крім групи зв'язування, молекули згідно із даним винаходом можуть додатково містити групу для збільшення періоду напівжиття молекули *in vivo*, таку як, але не обмежуючись ними, поліетиленгліколь (ПЕГ), сироватковий альбумін людини, групи глікозилування, жирні кислоти і декстран. Такі додаткові групи можна кон'югувати або будь-яким іншим способом об'єднати із групами зв'язування із застосуванням способів, добре відомих у даній області техніки.

У наступному аспекті даного винаходу запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність зв'язуючої молекули, яка зв'язується з CD134, згідно з першим аспектом даного винаходу. Амінокислотна послідовність, яку кодує молекула нуклеїнової кислоти, може являти собою будь-яку частину інтактного антитіла, таку як CDR, послідовність, що містить одну, дві або три CDR, або варіабельну область важкого або легкого ланцюга, або може являти собою повнорозмірний важкий ланцюг або легкий ланцюг. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти кодує амінокислотну послідовність, яка містить (1) область CDR3, зокрема, область CDR3 важкого ланцюга клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5; (2) варіабельну область важкого ланцюга або варіабельну область легкого ланцюга клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5; або (3) важкий ланцюг або легкий ланцюг клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5. Згідно з іншими варіантами реалізації даного винаходу молекула нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, обрану із групи, що включає SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 або 19, або із групи, що включає SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або 11.

Молекули нуклеїнової кислоти, запропоновані в даному винаході, можна одержати з будь-якого джерела, яке продукує антитіло проти CD134 згідно із даним винаходом. мРНК клітин, продукуючих антитіло проти CD134, можна виділити за допомогою стандартних методик, клонувати і/або ампліфікувати із застосуванням ПЛР і методик конструювання і піддати скринінгу із застосуванням стандартних протоколів для одержання молекул нуклеїнової кислоти, що кодують амінокислотну послідовність антитіла проти CD134. мРНК можна застосовувати для одержання кДНК для застосування в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) або кДНК для клонування генів антитіла. Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу молекулу нуклеїнової кислоти одержують із гібридами, яка експресує антитіло проти CD134, описане вище, переважно гібридами, однією з партнерів злиття якої є клітина трансгенної тварини, відмінної від людини, яка експресує гени імуноглобуліну людини. Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу гібридома отримана з нетрансгенної тварини, відмінної від людини.

Молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла проти CD134, можна сконструювати шляхом злиття молекули нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує константну область важкого ланцюга. Аналогічно, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг антитіла проти CD134, можна сконструювати шляхом злиття молекули нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область легкого ланцюга, з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує константну область легкого ланцюга. Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують ланцюги VH і VL, можуть бути перетворені в гени повнорозмірного антитіла шляхом вбудовування даних молекул у вектори експресії, що вже кодують константну область важкого ланцюга і константну область

легкого ланцюга, відповідно, так, що сегмент VH функціонально пов'язаний із сегментом (сегментами) константної області важкого ланцюга (CH) у межах вектора і сегмент VL функціонально пов'язаний із сегментом константної області легкого ланцюга (CL) у межах вектора. В якості альтернативи, молекули нуклеїнової кислоти, що кодують ланцюги VH або VL, перетворюють у гени повнорозмірного антитіла шляхом приєднання, наприклад, лігування, молекули нуклеїнової кислоти, що кодує ланцюг VH, до молекули нуклеїнової кислоти, що кодує ланцюг CH, із застосуванням стандартних методик молекулярної біології. Даного результату можна досягти і із застосуванням молекул нуклеїнової кислоти, що кодують ланцюги VL і CL. Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують повнорозмірні важкий і/або легкий ланцюги, потім можна експресувати у клітині, у яку були введені дані молекули, і виділити антитіло проти CD134.

Молекули нуклеїнової кислоти можна застосовувати для рекомбінантної експресії більших кількостей антитіл проти CD134, як описано нижче. Молекули нуклеїнової кислоти можна також застосовувати для одержання інших зв'язуючих молекул, запропонованих у даному винаході, таких як химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, імуноадгезини, діатіла, мутуючі антитіла, біспецифічні антитіла і похідні антитіл, описані у даній заявці. Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу молекулу нуклеїнової кислоти застосовують в якості зонда або ПЛР-праймера для конкретних послідовностей антитіла. Наприклад, зонд молекули нуклеїнової кислоти можна застосовувати в способах діагностики, або ПЛР-праймер молекули нуклеїнової кислоти можна застосовувати для ампліфікації областей ДНК, які можна використовувати, серед іншого, для виділення послідовностей нуклеїнової кислоти для застосування при одержанні варіабельних областей антитіл проти CD134.

Якщо отримані молекули ДНК, що кодують сегменти VH і VL антитіла проти CD134, даними молекулами ДНК можна потім маніпулювати із застосуванням методик рекомбінантної ДНК, наприклад, для перетворення варіабельної області генів у гени ланцюгів повнорозмірного антитіла, у гени Fab-фрагмента, у ген scFv, або дану варіабельну область можна вмонтувати в біспецифічні антитіла.

У наступному аспекті даного винаходу запропоновано вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти, описану в даній заявці вище. Молекула нуклеїнової кислоти може кодувати частину легкого ланцюга або важкого ланцюга (таку як CDR або варіабельну область), повнорозмірний легкий або важкий ланцюг, поліпептид, який містить частину або повнорозмірний важкий або легкий ланцюг, або амінокислотну послідовність похідного антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента.

Приклад підходящого вектора експресії являє собою вектор, який кодує функціонально повну послідовність CH або CL імуноглобуліну людини з відповідними сайтами рестрикції, сконструйованими таким чином, що будь-яка послідовність VH або VL може бути вбудована і експресована. Вектор експресії може кодувати сигнальний пептид, який полегшує секрецію амінокислотної послідовності ланцюга антитіла із клітини-господаря. ДНК, що кодує амінокислотну послідовність ланцюга антитіла, можна клонувати у вектор так, щоб сигнальний пептид був зв'язаний у рамці зчитування з аміно-кінцем амінокислотної послідовності ланцюга антитіла. Сигнальний пептид може являти собою сигнальний пептид імуноглобуліну або гетерологічний сигнальний пептид (тобто сигнальний пептид білка, відмінного від імуноглобуліну). Крім послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність антитіла проти CD134 (гени VH, VL антитіла, повнорозмірних важкого і/або повнорозмірного легкого ланцюга), вектори експресії несуть регуляторні послідовності, які контролюють експресію генів ланцюга антитіла в клітині-господарі. Дизайн вектора експресії, у тому числі відбір регуляторних послідовностей, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-господаря, яку будуть трансформувати, рівня експресії бажаного білка і подібних факторів. Регуляторні послідовності для експресії в клітинах-господарах ссавців включають вірусні елементи, які направляють високі рівні експресії білка в клітинах ссавців, такі як промотори і/або енхансери, отримані з ретровірусних LTR, цитомегаловірусу (CMV) (такі як промотор/енхансер CMV), вірусу мавп 40 (SV40) (такі як промотор/енхансер SV40), аденовірусу, (наприклад, великий пізній промотор аденовірусу (AdMLP)), поліоми, а також сильні промотори ссавців, такі як промотори нативного імуноглобуліну і актину.

Клітина-господар може являти собою клітину ссавця, комаху, рослини, бактерії або дріжджів. Приклади клітинних ліній ссавців, що підходять для використання в якості клітини-господаря, включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини NS0, клітини PER-C6, клітини SP2/0, клітини HEK-293T, клітини NIH-3T3, клітини HeLa, клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK), клітини нирки африканської зеленої мавпи (COS), клітини гепатоклітинної карциноми людини (наприклад, Нер G2), клітини легені людини, клітини A549 і

численну кількість інших клітинних ліній. Приклади ліній клітин комах включають клітини Sf9 або Sf21.

Приклади клітин-господарів рослин включають види *Nicotiana*, арабідопсис, ряску, кукурудзу, пшеницю, картоплю і подібні рослини. Бактеріальні клітини-господарі включають *E. coli* і види *Streptomyces*.

Приклади клітин-господарів дріжджів включають *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia pastoris*.

Амінокислотні послідовності зв'язуючої молекули, яка експресується різними клітинними лініями або в трансгенних тваринах, можуть мати різне глікозилування. Однак усі зв'язуючі молекули, що кодуються молекулами нуклеїнової кислоти, запропонованими в даній заявці, або, що містять амінокислотні послідовності, запропоновані в даній заявці, є частиною даного винаходу, незалежно від глікозилування зв'язуючих молекул.

В іншому аспекті даного винаходу запропоновано спосіб одержання молекули, що зв'язує CD134, як визначено вище, із застосуванням фагового дисплея. Зазначений спосіб включає (a) синтез бібліотеки антитіл людини на фаги, (b) скринінг бібліотеки із застосуванням CD134 або її частини, (c) виділення фагу, який зв'язується з CD134 або його частиною, і (d) одержання антитіла з фагу. Один типовий спосіб одержання бібліотеки антитіл включає наступні етапи: (a) імунізація тварини, відмінної від людини, що містить локус імуноглобуліну людини, за допомогою CD134 або його антигенної частини для утворення імунної відповіді; (b) виділення антитіло-продукуючих клітин з імунізованої тварини; (c) виділення РНК, що кодує легкий і важкий ланцюги антитіл проти CD134, з виділених клітин; (d) зворотна транскрипція РНК для одержання кДНК; (e), ампліфікація кДНК; і (f) вбудовування кДНК у вектор фагового дисплея, у результаті чого антитіла експресуються на фаги. Рекombінантні антитіла проти CD134 людини або антиген-зв'язуючі фрагменти зазначених антитіл можна виділити шляхом скринінга рекombінантних комбінаторних бібліотек антитіл. Бібліотеки можуть являти собою scFv-бібліотеки фагового дисплея, створені із застосуванням кДНК VL і VH людини, отриманих із мРНК, виділеної з В-клітин. Способи одержання і скринінга таких бібліотек відомі в даній області техніки. Набори для створення бібліотек фагового дисплея комерційно доступні.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу запропонована композиція, наприклад, фармацевтична композиція, що містить одну зв'язуючу молекулу або їх комбінацію, як описано в даній заявці, і необов'язково фармацевтично прийнятний носій. Композиції можна одержувати за допомогою загальноприйнятих способів, відомих у даній області техніки. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу композиція містить антитіло проти CD134 або антиген-зв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла. Згідно з конкретним варіантом реалізації даного винаходу композиція містить клон антитіла 12H3 і/або клон антитіла 20E5 або антиген-зв'язуючий фрагмент будь-якого з даних антитіл. Згідно з іншими варіантами реалізації даного винаходу композиція містить похідну клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5. Згідно з іншими варіантами реалізації даного винаходу фармацевтична композиція містить гуманізовані антитіла 12H3_VL1VH1, 12H3_VL1VH2, 12H3_VL1VH3, 12H3_VL2VH1, 12H3_VL2VH2, 12H3_VL2VH3, 20E5_VL1VH1, 20E5_VL1VH2, 20E5_VL1VH3, 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2 або 20E5_VL2VH3. Згідно з іншими варіантами реалізації даного винаходу фармацевтична композиція містить варіант гуманізованих антитіл, описаних вище, що містить варіабельні області важкого ланцюга згідно SEQ ID NO: 101-133 або 146-151. Термін "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до будь-якої неактивної речовини, яка підходить для застосування в сполуках для доставки зв'язуючої молекули. Носій може являти собою речовину, що перешкоджає склеюванню, речовину, що зв'язує, речовину, що покриває, розпушувач, наповнювач або розріджувач, консервант (такий як антиоксидант, антибактеріальний або протигрибковий засіб), підсолоджуючу речовину, засіб, що відтерміновує усмоктування, речовину, що змочує, емульгуючу речовину, буфер і таке інше.

Непептидні молекули згідно із даним винаходом можна вводити пероральним шляхом, у тому числі у вигляді суспензії, таблеток і таке інше. Рідкі сполуки можна вводити за допомогою інгаляції ліофілізованих мікрокапсул або мікрокапсул, що перебувають у формі аерозолі. Також можна застосовувати супозиторії. Можна застосовувати додаткові фармацевтичні носії, щоб контролювати тривалість дії молекули згідно із даним винаходом. Дозу і режим введення сполуки, яку вибирають, можна визначити в результаті стандартних процедур, добре відомих у даній області техніки. Такі процедури включають екстраполяцію передбачуваного режиму дозування на моделях на тваринах і визначення оптимального дозування в ході клінічного дослідження з метою визначення оптимальної дози на людях.

Композиції можуть перебувати в будь-яких підходящих формах, таких як рідкі, напівтверді і тверді лікарські форми. Різні лікарські форми композицій можна одержати за допомогою загальноприйнятих методик, відомих у даній області техніки.

Відносна кількість зв'язуючої молекули, що включена в композицію, буде варіювати залежно від численної кількості факторів, таких як бажані характеристики вивільнення і фармакодинамічні характеристики, конкретна застосовувана зв'язуюча молекула і носії, а також лікарська форма. Кількість зв'язуючої молекули в одиничній дозованій формі буде, як правило, 5 представляти ту кількість, яка викликає терапевтичний ефект, однак може також являти собою меншу кількість. Як правило, дана кількість буде варіювати від приблизно 0,001 відсотка до приблизно 99 відсотків, від приблизно 0,1 відсотка до приблизно 70 відсотків, або від приблизно 1 відсотка до приблизно 30 відсотків відносно загальної маси лікарської форми.

Крім зв'язуючої молекули, у композицію можна включити один або декілька додаткових 10 терапевтичних засобів або дані засоби можна застосовувати окремо в якості частини того ж режиму лікування. Приклади додаткових терапевтичних засобів описані в даній заявці нижче. Підходяща кількість додаткового терапевтичного засобу, який необхідно включити в композицію, може легко вибрати фахівець у даній області техніки; дана кількість буде варіювати залежно від численної кількості факторів, таких як конкретні застосовувані засіб і носії, лікарська 15 форма, бажані характеристики вивільнення і фармакодинамічні характеристики. Кількість додаткового терапевтичного засобу, включеного в одиничну лікарську форму, буде, як правило, являти собою таку кількість засобу, яка викликає терапевтичний ефект, однак може також являти собою меншу кількість.

Зв'язуючі молекули і фармацевтичні композиції, що містять зв'язуючу молекулу, 20 запропоновану в даному винаході, є придатними для терапевтичних, діагностичних або інших цілей, таких як підсилення імунної відповіді, лікування раку, підсилення ефективності інших варіантів терапії раку або підсилення ефективності вакцини, і мають численну кількість варіантів застосування, таких як застосування в якості лікарських препаратів або діагностичних засобів. Таким чином, згідно із переважним аспектом у даному винаході запропоновані способи 25 застосування зв'язуючих молекул або фармацевтичних композицій.

У наступному аспекті даного винаходу запропоновано спосіб модуляції протипухлинних імунних відповідей, опосередкованих CD134 людини, у тому числі підсилення ефекторної функції Teff людини, експресуючих CD134 людини, і/або послаблення супресивної функції Treg 30 людини, експресуючих CD134 людини, із застосуванням зв'язуючих молекул, які зв'язуються з CD134 людини, у тому числі антитіл проти CD134 людини, які (1) запобігають взаємодії існуючого в природі OX40L людини з рецептором CD134 людини і/або (2) не блокують клітинну передачу сигналів, опосередковану CD134 людини, після зв'язування з ним існуючого в природі OX40L людини.

У наступному аспекті даного винаходу запропоновано спосіб модуляції протипухлинних імунних відповідей, опосередкованих CD134 людини, у тому числі підсилення ефекторної 35 функції Teff людини, експресуючих CD134 людини, і/або послаблення супресивної функції Treg людини, експресуючих CD134 людини, із застосуванням зв'язуючих молекул, які зв'язуються з CD134 людини, описаних у даній заявці.

В іншому аспекті даного винаходу запропоновано спосіб модуляції протипухлинних імунних 40 відповідей, опосередкованих CD134 людини, причому зазначений спосіб не включає зв'язуючі молекули, які зв'язуються з CD134 людини, у тому числі антитіла проти CD134 людини, такі як міметики OX40L людини, які взаємодіють із доменом зв'язування OX40L людини на рецепторі CD134 людини і/або блокують клітинну передачу сигналів OX40L людини-CD134 людини.

У даному винаході розкриті зв'язуючі молекули, які зв'язуються з CD134 людини, у тому 45 числі антитіла проти CD134 людини, для протипухлинних терапевтичних цілей. Антитіла проти CD134 людини зв'язуються з позаклітинним доменом CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіла проти CD134 людини зв'язуються з областями зв'язування, відмінними від областей зв'язування OX40L (тобто антитіла проти CD134 людини не повністю блокують зв'язування OX40L людини з CD134 людини) на позаклітинному домені 50 CD134 людини на активованих Teff людини і Treg людини.

Відповідно одному конкретному аспекту даного винаходу запропоновані способи підсилення імунної відповіді у ссавця, що включають введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективною кількістю зв'язуючої молекули, описаної в даній заявці. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою антитіло проти CD134 або антиген- 55 зв'язуючий фрагмент зазначеного антитіла, і ссавець являє собою людину. Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою клон антитіла 12H3 і/або клон антитіла 20E5, або антиген-зв'язуючий фрагмент будь-якого з даних антитіл, гуманізоване антитіло 12H3 або гуманізоване антитіло 20E5. Термін "підсилення імунної відповіді" означає стимулювання, індукування, збільшення, поліпшення або розширення будь-якої відповіді імунної 60 системи ссавця. Імунна відповідь може являти собою клітинну відповідь (тобто клітинно-

опосередковану, таку як відповідь, опосередкована цитотоксичними Т-лімфоцитами), або гуморальна відповідь (тобто антитіло-опосередкована відповідь), а також може являти собою первинну або вторинну імунну відповідь. Приклади підсилення імунної відповіді включають збільшення Т-клітинної активності CD4+ хелперів і утворення цитолітичних Т-клітин. Підсилення імунної відповіді можна оцінити із застосуванням численної кількості вимірювань *in vitro* або *in vivo*, відомих фахівцям у даній області техніки, включаючи, але не обмежуючись ними, аналізи цитотоксичних Т-лімфоцитів, вивільнення цитокінів (наприклад, продукції ІЛ-2), ремісії пухлин, виживаності тварин, що несуть пухлину, продукції антитіл, проліферації імунних клітин, експресії маркерів клітинної поверхні і цитотоксичності. Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зазначений спосіб підсилює клітинну імунну відповідь, зокрема, цитотоксичну відповідь Т-клітин.

В одному аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому при насичуючій концентрації, зазначеної зв'язуючої молекули або при концентрації, що перевищує насичуючу концентрацію, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 70 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини, що вимірюють методом флуоресцентного аналізу на основі проточної цитометрії, описаним у прикладі 2(f). Більш переважно, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на приблизно 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 40 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, або переважно зменшення зв'язування відсутнє повністю.

В іншому аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, причому при концентрації зв'язуючої молекули 70 нМ ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 70 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини, що вимірюють методом флуоресцентного аналізу на основі проточної цитометрії, описаним у прикладі 2(f). Більш переважно, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на приблизно 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 40 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, або переважно зменшення зв'язування відсутнє повністю.

В іншому аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, яке містить (1) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12, і (2) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, що було показано в результаті перехресної конкуренції між неміченою зазначеною зв'язуючою молекулою і флуоресцентно-міченим зазначеним антитілом на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини, яку вимірюють методом проточної цитометрії (описаний нижче в прикладі 2(e)). Зв'язування із зазначеним антитілом при насичуючій концентрації, або при концентрації, що перевищує насичуючу концентрацію, зменшується щонайменше на приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 %, або приблизно 80 %, або приблизно 90 % або більше, або припиняється при аналізі перехресної конкуренції із зазначеною зв'язуючою молекулою.

В іншому аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, яке містить (1) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, і (2) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, що було показано в результаті перехресної конкуренції між неміченою зазначеною зв'язуючою молекулою і флуоресцентно-міченим зазначеним антитілом на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини, яку вимірюють методом проточної цитометрії (описаний нижче в прикладі 2(e)). Зв'язування із зазначеним антитілом при насичуючій концентрації, або при концентрації, що перевищує насичуючу концентрацію, зменшується щонайменше на приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 %, або приблизно 80 %, або приблизно 90 % або більше, або припиняється при аналізі перехресної конкуренції із зазначеною зв'язуючою молекулою.

В іншому аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини, зменшується не більше ніж на приблизно 70 %, або приблизно 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 40 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше зв'язуючою молекулою, і причому зазначена зв'язуюча молекула також не перешкоджає імуностимулюючим і/або проліферативним відповідям OX40L людини на Т-ефекторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

В іншому аспекті даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L), і причому зазначена зв'язуюча молекула також

молекула інгібує проліферативні відповіді OX40L людини на T-регуляторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

5 Підходящий спосіб вимірювання одночасного зв'язування OX40L і антитіла проти CD134 описується у такий спосіб. Флуоресцентний сигнал ФІТЦ (середня геометрична або середня інтенсивність флуоресценції (СІФ)) зв'язування OX40L людини на стимульованих ФГА МКПК (мононуклеарних клітинах периферичної крові), експресуючих CD134 людини, при відсутності антитіла проти CD134 людини приймають за 100 %. Флуоресцентний сигнал ФЕ (фікоеритрин) (СІФ) зв'язування антитіла проти CD134 людини на стимульованих ФГА МКПК, експресуючих CD134 людини, при відсутності OX40L людини приймають за 100 %. Зменшення даного флуоресцентного сигналу ФІТЦ і флуоресцентного сигналу ФЕ, коли до стимульованих ФГА МКПК, експресуючим CD134 людини, одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно не перевищує приблизно 70 %, або приблизно 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 40 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

15 Підходящий спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40 L-опосередкованим проліферативним відповідям Teff є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Teff, експресуючі CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зміна (тобто зменшення або збільшення) даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Teff, експресуючим CD134 людини, одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно не перевищує приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

20 Підходящий спосіб вимірювання підсилення опосередкованих OX40L проліферативних відповідей Teff є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Teff, експресуючі CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Підсилення даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Teff, експресуючих CD134 людини, одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно становить більше ніж приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 %, або більше.

25 Підходящий спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40 L-опосередкованої супресорної функції Treg є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Teff, експресуючі CD134 людини, які культивують разом з Treg, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Teff/Treg=1:1), після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зміна (тобто зменшення або збільшення) даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Teff, експресуючих CD134 людини, які культивують разом з Treg, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Teff/Treg=1:1), одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно не перевищує приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

30 Підходящий спосіб вимірювання підсилення OX40 L-опосередкованої супресорної функції Treg є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Teff, експресуючі CD134 людини, які культивують разом з Treg, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Teff/Treg=1:1), після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Підсилення даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Teff, експресуючих CD134 людини, які культивують разом з Treg, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Teff/Treg=1:1), одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно становить більше ніж приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 %, або більше.

35 Підходящий спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40 L-опосередкованих проліферативних відповідей Treg є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Treg, експресуючі CD134 людини, після обробки OX40L людини, приймають за 100 %. Зміна (тобто зменшення або збільшення) даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Treg, експресуючих CD134 людини, одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, переважно не перевищує приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

Підходящий спосіб вимірювання інгібування опосередкованих OX40L проліферативних відповідей Treg є наступним. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Treg, експресуючі CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зменшення даного включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли до активованих (наприклад, стимульованих ФГА або стимульованих бусинами з антитілами проти CD3/антитілами проти CD28) Treg, експресуючих CD134 людини, одночасно додають як OX40L людини, так і антитіла проти CD134 людини, становить переважно більше ніж приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 %, або більше.

В іншому аспекті даного винаходу запропоновано спосіб лікування раку у ссавця, що включає введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули, описаної в даній заявці.

Згідно з деяким варіантом реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою клон антитіла 12H3 і/або клон антитіла 20E5 або антиген-зв'язуючий фрагмент будь-якого з даних антитіл. Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу ссавець являє собою людину.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою антитіло 12H3_VL1VH1, що містить VH згідно SEQ ID NO: 69 і VL згідно SEQ ID NO: 67.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою антитіло 12H3_VL1VH2, що містить VH згідно SEQ ID NO: 70 і VL згідно SEQ ID NO: 67.

Відповідно іншому переважному варіанту реалізації даного винаходу запропонований спосіб запобігання раку у ссавця, що включає введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули, описаної в даній заявці.

Термін "запобігання раку" відноситься до відстрочення, інгібування або запобігання маніфестації раку у ссавця, у якого маніфестації канцерогенезу або онкогенезу не доведені, але виявлена схильність до раку, яка була визначена, наприклад, у результаті генетичного скринінгу або будь-яким іншим способом. Даний термін також охоплює лікування ссавця, що має передпухлинний стан, з метою зупинки прогресії або індукції ремісії передпухлинних станів у напрямку злоякісного новоутворення. Приклади передпухлинних станів включають гіперплазію, дисплазію і метаплазію. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою антитіло проти CD134 або фрагмент зазначеного антитіла, як описано в даній заявці. Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу запропонована зв'язуюча молекула, обрана із клону антитіла 12H3 і/або клону антитіла 20E5, або антиген-зв'язуючий фрагмент будь-якого з даних антитіл. Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу ссавець являє собою людину.

Терміни "лікувати" або "лікування" відносяться як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних або превентивних заходів, метою яких є запобігання або вповільнення (зменшення) небажаної фізіологічної зміни або порушення, такого як розвиток або поширення пухлини або клітин пухлини. Корисні або бажані клінічні результати включають полегшення симптомів, зниження ступеня захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання, відстрочення або вповільнення прогресування захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення стану захворювання, а також ремісію (часткову або повну), таку, що можливо або неможливо визначити. "Лікування" також може позначати продовження тривалості життя в порівнянні з очікуваною тривалістю життя, якби суб'єкт не одержував лікування. Суб'єкти, що мають потребу в лікуванні включають, як таких, що вже мають патологічний стан або порушення, так і схильних до стану або порушення, або суб'єктів, у яких стан або порушення необхідно запобігти. Будь-які з антитіл згідно із даним винаходом можна застосовувати в зазначених способах згідно із даним винаходом.

Інший варіант реалізації даного винаходу являє собою спосіб лікування раку, що включає введення пацієнтові, який має потребу в такому лікуванні, антитіла проти CD134, що містить VH згідно SEQ ID NO: 152 і VL згідно SEQ ID NO: 100, протягом часу, якого достатньо для лікування раку.

Інший варіант реалізації даного винаходу являє собою спосіб лікування раку, що включає введення пацієнтові, який має потребу в такому лікуванні, антитіла проти CD134, що містить VH згідно SEQ ID NO: 134 і VL згідно SEQ ID NO: 98, протягом часу, якого достатньо для лікування раку.

Інший варіант реалізації даного винаходу являє собою спосіб лікування раку, що включає введення пацієнтові, який має потребу в такому лікуванні, антитіла проти CD134, що містить

VH згідно SEQ ID NO: 67 і VL згідно SEQ ID NO: 69;

VH згідно SEQ ID NO: 67 і VL згідно SEQ ID NO: 70;

VH згідно SEQ ID NO: 67 і VL згідно SEQ ID NO: 71;

VH згідно SEQ ID NO: 68 і VL згідно SEQ ID NO: 69;

VH згідно SEQ ID NO: 68 і VL згідно SEQ ID NO: 70; або
 VH згідно SEQ ID NO: 68 і VL згідно SEQ ID NO: 71;
 протягом часу, якого достатньо для лікування раку.

5 Численна кількість варіантів раку, у тому числі злоякісні або доброякісні і/або первинні або
 вторинні, можна лікувати або запобігати способом згідно із даним винаходом. Приклади таких
 варіантів раку відомі фахівцям у даній області техніки і перераховані в стандартних посібниках,
 таких як Merck Manual of Diagnosis and Therapy (опублікований Merck). Згідно з деякими
 варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак, який, як правило, піддається
 10 імунотерапії, але також рак, який раніше не піддавали імунотерапії. Типові варіанти раку
 являють собою меланому (наприклад, метастатичну злоякісну меланому), ренальний рак
 (наприклад, світлоклітинну карциному), рак передміхурової залози (наприклад,
 гормонорезистентну аденокарциному передміхурової залози), аденокарциному підшлункової
 залози, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак легенів (наприклад, недрібноклітинний рак
 15 легенів), рак стравоходу, пласкоклітинну карциному голови і шиї, рак печінки, рак яєчників, рак
 шийки матки, рак щитоподібної залози, гліобластому, гліому, лейкоз, лімфому і інші злоякісні
 новоутворення. Рак може являти собою таку, що не піддається лікуванню або рецидивуючу
 злоякісну карциному, лімфому, бластому, саркому і лейкоз, пласкоклітинний рак, рак легенів (у
 тому числі дрібноклітинний рак легенів, недрібноклітинний рак легенів, аденокарциному легенів
 і пласкоклітинну карциному легенів), рак черевної порожнини, гепатоклітинний рак, гастричний
 20 рак або рак шлунку (у тому числі рак шлунково-кишкового тракту), рак підшлункової залози,
 гліобластому, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак
 молочної залози, рак товстої кишки, рак товстої і прямої кишок, карциному ендометрія або
 матки, карциному слинних залоз, рак нирок або ренальний рак, рак печінки, рак передміхурової
 залози, рак зовнішніх жіночих статевих органів, рак щитоподібної залози, карциному печінки і
 25 різні типи раку голови і шиї, а також В-клітинну лімфому (у тому числі неходжкінську лімфому
 (НХЛ) низького ступеня злоякісності/фолікулярну НХЛ; дрібноклітинну лімфоцитарну (ДЛ) НХЛ;
 НХЛ середнього ступеня злоякісності/фолікулярну НХЛ; дифузійну НХЛ середнього ступеня
 злоякісності; імунобласний НХЛ високого ступеня злоякісності; лімфобласний НХЛ високого
 ступеня злоякісності; дрібноклітинну НХЛ із нерозсіченими ядрами високого ступеня
 30 злоякісності; НХЛ із масивною лімфаденопатією; мантийноклітинну лімфому; лімфому,
 викликану СНІДом; і макроглобулінемію Вальденстрема); хронічний лімфоцитарний лейкоз
 (ХЛЛ); гострий лімфобласний лейкоз (ГЛЛ); волосяноклітинний лейкоз; хронічний мієлобласний
 лейкоз; множинну мієлому і посттрансплантаційне лімфопроліферативне порушення (ПТЛП).

Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу зв'язуючі молекули можна вводити самі
 35 по собі у вигляді монотерапії або вводити в комбінації з одним або декількома додатковими
 терапевтичними засобами або терапіями. Таким чином, згідно з іншим варіантом реалізації
 даного винаходу запропонований спосіб лікування або запобігання раку шляхом комбінованої
 терапії, причому зазначений спосіб включає введення зв'язуючої молекули, описаної в даній
 заявці, у комбінації з однією або декількома додатковими терапіями або терапевтичними
 40 засобами. Термін "додаткова терапія" відноситься до терапії, у якій в якості терапевтичного
 засобу не використовується зв'язуюча молекула, запропонована в даному винаході. Термін
 "додатковий терапевтичний засіб" відноситься до будь-якого терапевтичного засобу, відмінного
 від зв'язуючої молекули, запропонованої в даному винаході. Згідно з деякими варіантами
 реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою клон 12Н3 і/або клон 20Е5 антитіла
 45 проти CD134 людини, антиген-зв'язуючий фрагмент будь-якого з даних антитіл або
 гуманізоване антитіло 12Н3 або гуманізоване антитіло 20Е5. Відповідно одному конкретному
 аспекту в даному винаході запропонована комбінована терапія для лікування раку у ссавця, яка
 включає введення зазначеному ссавцеві терапевтично ефективної кількості зв'язуючої
 молекули, запропонованої в даному винаході, у комбінації з одним або декількома додатковими
 50 терапевтичними засобами. Згідно з наступним варіантом реалізації даного винаходу ссавець
 являє собою людину.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак
 передміхурової залози, рак товстої кишки, рак легенів, гематобластоз, меланому або рак
 сечового міхура.

55 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак
 передміхурової залози.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак товстої кишки.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак легенів.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою гематобластоз.

60 Згідно з деяким варіантом реалізації рак являє собою меланому.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак сечового міхура.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак легенів являє собою дрібноклітинний рак легенів, недрібноклітинний рак легенів, аденокарциному легенів або пласкоклітинну карциному легенів.

Широку різноманітність терапевтичних засобів для лікування раку можна застосовувати в комбінації зі зв'язуючою молекулою. Середньому фахівцеві в даній області техніки відома наявність і розвиток інших терапій раку, які можна застосовувати в комбінації зі способами і зв'язуючими молекулами згідно із даним винаходом і які не обмежені формами терапії, викладеними в даній заявці. Приклади категорій додаткових терапевтичних засобів, які можна застосовувати в комбінованій терапії для лікування раку, включають (1) хіміотерапевтичні засоби, (2) імунотерапевтичні засоби і (3) гормональні терапевтичні засоби.

Термін "хіміотерапевтичний засіб" відноситься до хімічної або біологічної речовини, яка може викликати загибель ракових клітин або перешкоджати розподілу, відновленню, росту і/або функції ракових клітин. Приклади хіміотерапевтичних засобів включають засоби, що описані в заявках WO 2006/088639, WO 2006/129163 і US 20060153808, опис яких включено в дану заявку за допомогою посилання.

Термін "імунотерапевтичні засоби" відноситься до хімічної або біологічної речовини, яка може підсилювати імунну відповідь ссавця. Приклади імунотерапевтичних засобів включають: бацилу Кальметта-Герена (BCG); цитокіни, такі як інтерферони; вакцини, такі як персоналізована імунотерапія MyVax, OnyVax-P, Oncophage, GRNVAC1, Favid, Provence, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX і NeuVax; і антитіла, такі як алемтузумаб (CAMPATH®), бевацизумаб (AVASTIN®), цетуксимаб (ERBITUX®), гемтузумаб озогаміцин (MYLOTARG®), ібритумомаб тіуксетан (ZEVALIN®), панітумомаб (VECTIBIX®), ритуксимаб (RITUXAN®, MABTHERA®), трастузумаб (HERCEPTIN®), тоситумомаб (BEXXAR®), тремелімумаб, CAT-3888 і антитіла-агоністи рецептора CD40, описані в міжнародній заявці WO 2003/040170.

Термін "засіб для гормональної терапії" відноситься до хімічної або біологічної речовини, інгібуючого або пригнічуючого утворення гормону або інгіуючого або протидіючого ефекту гормону на ріст і/або виживаність ракових клітин. Приклади таких засобів, що підходять для способів, описаних у даній заявці, включають засоби, розкриті в US 20070117809. Приклади конкретних засобів для гормональної терапії включають тамоксифен (NOLVADEX®), торемифен (Fareston), фулвестрант (FASLODEX®), анастрозол (ARIMIDEX®), ексеместан (AROMASIN®), летрозол (FEMARA®), ацетат мегестролу (MEGACE®), гoserелін (ZOLADEX®) і леупролід (LUPRON®). Зв'язуючі молекули згідно із даним винаходом можуть також бути використані в комбінації з нелікарськими гормональними терапіями, такими як (1) хірургічні способи повного або часткового видалення органів або залоз, о приймали участь в утворенні гормону, таких як яєчники, яєчка, надниркова залоза і гіпофіз, і (2) променева терапія, при якій на органи або залози пацієнта впливають випромінюванням у кількості, достатній для інгібування або пригнічення утворення цільового гормону.

Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу запропонований спосіб лікування або запобігання раку шляхом комбінованої терапії, причому зазначений спосіб включає введення зв'язуючої молекули, описаної в даній заявці, і хірургічного втручання для видалення пухлини. Зв'язуючу молекулу можна вводити ссавцеві перед, під час або після зазначеного хірургічного втручання.

Комбінована терапія для лікування раку також охоплює комбінацію зв'язуючої молекули, запропонованої в даному винаході, із променевою терапією, такою як іонізуюча (електромагнітна) променева терапія (наприклад, рентгенівське випромінювання або гама-випромінювання) і променева терапія пучком незаряджених часток (наприклад, випромінювання з високою лінійною передачею енергії). Джерело випромінювання може бути розташоване поза або усередині ссавця. Зв'язуючу молекулу можна вводити ссавцеві перед, під час або після променевої терапії.

Зв'язуючі молекули і композиції, запропоновані в даному винаході, можуть бути введені будь-яким підходящим ентеральним або парентеральним шляхом введення. Термін "ентеральний шлях" введення відноситься до введення через будь-яку частину шлунково-кишкового тракту. Приклади ентеральних шляхів введення включають пероральний, трансмукозальний, трансбуккальний і ректальний шлях введення або внутрішньошлунковий шлях уведення. "Парентеральний шлях" введення відноситься до шляху введення, відмінного від ентерального шляху введення. Підходящий шлях і спосіб введення можуть варіювати залежно від численної кількості факторів, таких як конкретне використовуване антитіло, бажана швидкість усмокування, конкретна використовувана композиція або лікарська форма, тип або

тяжкість розладу, який піддають лікуванню, конкретне місце дії і стан пацієнта, і можуть бути легко обрані фахівцем у даній області техніки.

Термін "терапевтично ефективна кількість" зв'язуючої молекули відноситься до кількості, ефективній для передбачуваної терапевтичної мети. Наприклад, у контексті підсилення імунної відповіді "терапевтично ефективна кількість" являє собою будь-яку кількість, яка є ефективною для стимулювання, індукування, підвищення, поліпшення або підсилення будь-якої відповіді імунної системи ссавця. У контексті лікування захворювання "терапевтично ефективна кількість" являє собою будь-яку кількість, достатню для надання будь-якого бажаного або корисного ефекту у ссавця, що одержує лікування, такого як інгібування наступного росту або поширення ракових клітин, загибель ракових клітин, інгібування повторного виникнення раку, зменшення болю, пов'язаного з раком, поліпшення виживаності ссавця. У способі запобігання раку "терапевтично ефективна кількість" являє собою будь-яку кількість, ефективну для відстрочення, інгібування або запобігання маніфестації раку у ссавця, якому вводять зв'язуючу молекулу.

Терапевтично ефективна кількість зв'язуючої молекули зазвичай варіює від приблизно 0,001 до приблизно 500 мг/кг і частіше від приблизно 0,05 до приблизно 100 мг/кг маси тіла ссавця. Наприклад, зазначена кількість може становити приблизно 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 50 мг/кг або 100 мг/кг маси тіла ссавця. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу терапевтично ефективна кількість антитіла проти CD134 людини перебуває в діапазоні приблизно від 0,1 до 30 мг/кг маси тіла ссавця. Конкретний рівень дози для введення може бути легко визначений фахівцем у даній області техніки і буде залежати від численної кількості факторів, таких як тип і тяжкість порушення, яке піддають лікуванню, конкретна використовувана зв'язуюча молекула, шлях уведення, час уведення, тривалість лікування, конкретна застосовувана додаткова терапія, вік, стать, маса тіла, стан, загальний стан здоров'я і попередній анамнез пацієнта, що одержує лікування, і подібних факторів, добре відомих в даній області техніки.

Зв'язуючу молекулу або композицію зазвичай вводять декілька разів. Інтервали між окремими дозами можуть становити, наприклад, тиждень, місяць, три місяці або рік. Типовий режим лікування включає введення один раз на тиждень, один раз кожні два тижні, один раз кожні три тижні, один раз кожні чотири тижні, один раз на місяць, один раз кожні 3 місяці або один раз кожні 6 місяців. Типові режими лікування для антитіла проти CD134 людини включають внутрішньовенне введення 1 мг/кг маси тіла або 3 мг/кг маси тіла із застосуванням одного з наступних режимів дозування: (1) кожні чотири тижні для шести введень, потім кожні три місяці; (2) кожні три тижні; (3) 3 мг/кг маси тіла однократно з наступним уведенням 1 мг/кг маси тіла кожні три тижні.

У даному винаході запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L). Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу при насичуючій концентрації, зазначеної молекули або при концентрації, що перевищує насичуючу концентрацію, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 50 % на T-клітинах, експресуючих CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу при концентрації зв'язуючої молекули 70 нМ ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується на не більше ніж 70 % на T-клітинах, експресуючих CD134 людини.

У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула, яка містить:

- (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або
- (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула містить

- (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:14 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни;
- (b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:15 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або
- (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:16 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Згідно із переважним варіантом реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула містить

- (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни;
- (b) CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

(c) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула, яка конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, що містять:

5 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12; і

(b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:13.

Також запропонована зв'язуюча молекула, яка містить:

10 (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

(b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

15 Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом містить

(a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни;

(b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:7 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

20 (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:8 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом містить

25 (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:9 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни;

(b) CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

(c) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

30 Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, яке містить:

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4; і

35 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5.

Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула специфічно зв'язується з епітопом амінокислотної послідовності позаклітинного домену CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містять амінокислотну послідовність:

40 (a) SEQ ID NO:34;

(b) SEQ ID NO:35

(c) SEQ ID NO:36;

(d) SEQ ID NO:38; і/або

(d) SEQ ID NO:92.

45 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L) на імунокомпетентних клітинах людини, експресуючих CD134 людини (наприклад, активованих Teff і/або активованих Treg), які залучені в інгібування росту пухлинних клітин людини.

50 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула підсилює зв'язування і/або імуностимулюючі відповіді ліганда OX40 людини (OX40L) на імунокомпетентних клітинах людини, експресуючих CD134 людини (наприклад, активованих Teff і/або активованих Treg), які залучені в інгібування росту пухлинних клітин людини.

55 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L) і не перешкоджає імуностимулюючим і/або проліферативним відповідям OX40L людини на Т-ефекторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

60 У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L) і не підсилює імуностимулюючі і/або проліферативні відповіді OX40L людини на Т-ефекторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L) і не перешкоджає відповідям супресорної функції OX40L людини на Т-регуляторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

5 Також запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L) і підсилює відповіді супресорної функції OX40L людини на Т-регуляторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

10 Також запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L), але не перешкоджає проліферативним відповідям OX40L людини на Т-регуляторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

15 Також запропонована зв'язуюча молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню CD134 людини з лігандом OX40 (OX40L), але інгібує проліферативні відповіді OX40L людини на Т-регуляторних клітинах, експресуючих CD134 людини.

20 Зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою переважно зв'язуючу молекулу, причому при насичуючій концентрації, зазначеної молекули або при концентрації, що перевищує насичуючу концентрацію, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 50 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини.

Зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою переважно зв'язуючу молекулу, причому при концентрації зазначеної зв'язуючої молекули 70 нМ ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 70 % на Т-клітинах, експресуючих CD134 людини.

25 Відповідно одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою гуманізоване антитіло. Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою химерне, гуманізоване антитіло або антитіло Deimmunized™ або фрагмент зазначених антитіл.

30 Згідно ще одному варіанту реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою антитіло, міметик антитіла (наприклад, на основі кістяка, відмінного від кістяка антитіла), аптамер РНК, малу молекулу або CovX-Body.

Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом являє собою антитіло IgG, IgA, IgD, IgE або IgM, таке як антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

35 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча молекула являє собою антитіло IgG4.

40 Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антитіло являє собою антиген-зв'язуючий фрагмент антитіла, наприклад, який обраний із групи, що включає: Fv-фрагменти (наприклад, одноланцюгові Fv і зв'язані дисульфідними зв'язками Fv); Fab-подібні фрагменти (наприклад, Fab-фрагменти, Fab'-фрагменти і F(ab')₂-фрагменти); і доменні антитіла. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу антиген-зв'язуючий фрагмент або зв'язуюча група являє собою scFv. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча група являє собою рекомбінантне антитіло. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу зв'язуюча група являє собою моноклональне антитіло.

45 У даному винаході також запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує зв'язуючу молекулу за будь-яким пунктом попередньої формули винаходу, за умови, що зв'язуюча група являє собою поліпептид.

Також запропонований вектор, що містить щонайменше одну молекулу нуклеїнової кислоти згідно із даним винаходом.

50 Також запропонована клітина-господар, що містить вектор або нуклеїнову кислоту згідно із даним винаходом. Клітина-господар переважно отримана з ссавця або комахи.

У даному винаході також запропонований процес одержання зв'язуючої молекули згідно із даним винаходом, що включає наступні етапи (i) одержання молекул, що зв'язуються з CD134, і (ii) скринінг зазначених молекул з метою виявлення і одержання зв'язуючих молекул, які не запобігають зв'язуванню OX40L з CD134. Етап (ii) переважно включає виявлення зв'язуючих молекул, які зв'язуються з CD134 після впливу на CD134 насичуючій концентрації OX40L. Якщо зв'язуюча молекула являє собою моноклональне антитіло, процес одержання зв'язуючої молекули включає імунізацію тварини CD134 людини, одержання гібридом, секретуючих антитіла проти CD134, і скринінг для виявлення гібридом, продукуючих антитіла проти CD134. У даному винаході також запропонована зв'язуюча молекула згідно із даним винаходом або

отримана згідно із даним винаходом для застосування в запобіганні або лікуванні раку у суб'єкта, який має потребу в такому запобіганні або лікуванні. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак легенів, рак передміхурової залози, рак молочної залози, рак голови і шиї, рак стравоходу, рак шлунка, рак товстої кишки, рак товстої і прямої кишок, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак матки, рак яєчників, рак печінки, гематобластоз, меланому або будь-яке інше захворювання або порушення, яке характеризується неконтрольованим ростом клітин.

Також запропонований спосіб підсилення імунної відповіді в суб'єкта-людини, що включає введення зазначеному суб'єктові-людині терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули згідно із даним винаходом або отриманої згідно із даним винаходом і необов'язково фармацевтично прийняттого носія. Посилена імунна відповідь може включати збільшення імуностимулюючої/ефекторної функції Т-ефекторних клітин, необов'язково як результат проліферації даних клітин, і/або понижувальну регуляцію імуносупресорної функції Т-регуляторних клітин, необов'язково без експансії кількості даних клітин.

Також запропонований спосіб лікування раку у суб'єкта-людини, яка потребує такого лікування, що включає введення зазначеному суб'єктові-людині терапевтично ефективної кількості зв'язуючої молекули згідно із даним винаходом або отриманої згідно із даним винаходом. Згідно з деякими варіантами реалізації даного винаходу рак являє собою рак легенів, рак передміхурової залози, рак молочної залози, рак голови і шиї, рак стравоходу, рак шлунка, рак товстої кишки, рак товстої і прямої кишок, рак сечового міхура, рак шийки матки, рак матки, рак яєчників, рак печінки, гематобластоз, меланому або будь-яке захворювання або порушення, яке характеризується неконтрольованим ростом клітин.

Також запропонований спосіб зменшення розміру пухлини або інгібування росту ракових клітин у суб'єкта або зменшення або інгібування розвитку метастатичного раку у суб'єкта, що страждає від раку, що включає введення суб'єктові-людині зв'язуючої молекули згідно із даним винаходом або отриманої згідно із даним винаходом.

У даному винаході також запропоноване застосування зв'язуючої молекули згідно із даним винаходом або отриманої згідно із даним винаходом для одержання лікарського препарату для лікування або запобігання раку.

Також запропонована фармацевтична композиція, що містить зв'язуючу групу згідно із даним винаходом або отриману згідно із даним винаходом разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними розріджувачами або допоміжними речовинами. Композиція переважно є підходящою для парентерального введення в організм людини, наприклад, шляхом внутрішньовенного, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, інтраперитонеального, внутрішньопухлинного, інтравезикального, внутрішньоартеріального, інтратекального, інтракапсулярного, інтраорбітального, інтракардіального, транстрахеального, внутрішньосуглобного, субкапсулярного, субарахноїдального, інтраспінального, епідурального, інтратерестерального або підшкірного введення.

Додаткові варіанти реалізації даного винаходу

Нижче наведені деякі додаткові пронумеровані варіанти реалізації даного винаходу згідно з описами винаходу, представленими у даній заявці. Властивості варіантів реалізації даного винаходу, наведених вище, що описані, як такі, що мають відношення до винаходу, розкритого в даній заявці, також відносяться до кожного і усіх без винятку даних додаткових пронумерованих варіантів реалізації.

1. Виділене антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) згідно SEQ ID NO: 100 і варіабельну область важкого ланцюга (VH), який містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VL згідно SEQ ID NO: 100.

2. Антитіло згідно з варіантом реалізації 1, що відрізняється тим, що зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 152, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 152.

3. Антитіло згідно з варіантом реалізації 1 або 2, що відрізняється тим, що зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 99.

4. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-3, що відрізняється тим, що зазначена HCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16, 144 або 145.

5. Антитіло згідно з варіантом реалізації 4, що відрізняється тим, що зазначена HCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, 141, 142 або 143.

6. Антитіло згідно з варіантом реалізації 5, що відрізняється тим, що зазначена HCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14.

7. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-6, що відрізняється тим, що:
- а. зазначена VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67 або 68; і
 - б. зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 69, 70, 71, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 146, 147 або 148, які в деяких випадках містять заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків 11, 55 або 99; або
 - в. зазначені VL і VH містять амінокислотні послідовності
 - i. SEQ ID NO: 67 і 69, відповідно;
 - ii. SEQ ID NO: 67 і 70, відповідно;
 - iii. SEQ ID NO: 67 і 71, відповідно;
 - iv. SEQ ID NO: 68 і 69, відповідно;
 - v. SEQ ID NO: 68 і 70, відповідно; або
 - vi. SEQ ID NO: 68 і 71, відповідно.
8. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-7, що відрізняється тим, що заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків являють собою V11L, N55Q, N55A, N55E, M99L або M99I.
9. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-8, що відрізняється тим, що зазначена зв'язуюча молекула зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 92.
10. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-9, що відрізняється тим, що зазначене антитіло являє собою гуманізоване антитіло або антитіло DeimmunizedTM.
11. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-10, що відрізняється тим, що зазначене антитіло являє собою агоніст CD134.
12. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-11, що відрізняється тим, що зазначене антитіло відноситься до ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
13. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-12, що відрізняється тим, що зазначене антитіло містить заміну в Fc-області.
14. Антитіло згідно з варіантом реалізації 13, що відрізняється тим, що зазначена заміна модулює зв'язування антитіла з Fc-гама рецептором (FcγR) або з неонатальним Fc-рецептором (FcRn).
15. Антитіло згідно з варіантом реалізації 14, що відрізняється тим, що зазначена заміна включає заміну S267E/L328F, заміну E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, заміну V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S або заміну M252Y/S254T/T256E, де нумерація залишків наведена відповідно до EU Index.
16. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує VH або VL згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-3 або 7.
17. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти згідно з варіантом реалізації 16.
18. Клітина-господар, що містить вектор згідно з варіантом реалізації 17.
19. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-15, 23-37, 41-45 або 49 для застосування при лікуванні суб'єкта, який потребує підсилення імунної відповіді.
20. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-15, 23-37, 41-45 або 49 для застосування при лікуванні раку.
21. Антитіло згідно з варіантом реалізації 20 для застосування при лікуванні раку, причому рак являє собою рак передміхурової залози, рак товстої кишки, рак легенів, гематобластоз, меланому або рак сечового міхура.
22. Фармацевтична композиція, що містить антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 1-15, 23-37 або 41-45 і фармацевтично прийнятний носій.
23. Виділене антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) згідно SEQ ID NO: 98 і варіабельну область важкого ланцюга (VH), який містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VL згідно SEQ ID NO: 98.
24. Антитіло згідно з варіантом реалізації 23, що відрізняється тим, що зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 134, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 134.
25. Антитіло згідно з варіантами реалізації 23 або 24, що відрізняється тим, що зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 97, що необов'язково містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в VH згідно SEQ ID NO: 97.
26. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-25, що відрізняється тим, що зазначена HCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, 139 або 140.

27. Антитіло згідно з варіантом реалізації 26, що відрізняється тим, що зазначена HCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 або 138.

28. Антитіло згідно з варіантом реалізації 27, що відрізняється тим, що зазначена HCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

5 29. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-29, що відрізняється тим, що:

a. зазначена VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62 або 63; і

b. зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 або 151, у деяких випадках таку, що містить заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків 11, 56 або 106; або

c. зазначені VL і VH містять амінокислотні послідовності

i. SEQ ID NO: 62 і 64, відповідно;

ii. SEQ ID NO: 62 і 65, відповідно;

iii. SEQ ID NO: 62 і 66, відповідно;

15 iv. SEQ ID NO: 63 і 64, відповідно;

v. SEQ ID NO: 63 і 65, відповідно; або

vi. SEQ ID NO: 63 і 66, відповідно.

30. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-29, що відрізняється тим, що заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків являють собою V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L або M106I.

31. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-30, що відрізняється тим, що зазначене антитіло зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 або SEQ ID NO: 92.

32. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-31, що відрізняється тим, що зазначене антитіло являє собою гуманізоване антитіло або антитіло DeimmunizedTM.

33. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-32, що відрізняється тим, що зазначене антитіло являє собою агоніст CD134.

34. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-33, що відрізняється тим, що зазначене антитіло відноситься до ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

35. Антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-34, що відрізняється тим, що зазначене антитіло містить заміну в Fc-області.

36. Антитіло згідно з варіантом реалізації 35, що відрізняється тим, що зазначена заміна модулю зв'язування антитіла з Fc-гама рецептором (FcγR) або з неонатальним Fc-рецептором (FcRn).

37. Антитіло згідно з варіантом реалізації 36, що відрізняється тим, що зазначена заміна включає заміну S267E/L328F, заміну E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, заміну 234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S або заміну M252Y/S254T/T256E, де нумерація залишків наведена відповідно до EU Index.

38. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує VH або VL згідно будь-якому з варіантів реалізації 23-37.

39. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти згідно з варіантом реалізації 38.

40. Клітина-господар, що містить вектор згідно з варіантом реалізації 39.

41. Виділене агоністичне антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) і варіабельну область важкого ланцюга (VH), який містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і області, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, що відрізняється тим, що

a. зазначена HCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14;

b. зазначена HCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, 141, 142 або 143;

c. зазначена HCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16, 144 або 145;

d. зазначена LCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17;

e. зазначена LCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18; і

f. зазначена LCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19;

за умови, що зазначене антитіло не містить VH, що містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 згідно SEQ ID NO: 14, 15 і 16, і VL, що містить амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3 згідно SEQ ID NO: 17, 18 і 19.

42. Виділене антитіло згідно з варіантом реалізації 41, що відрізняється тим, що зазначене антитіло містить послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 згідно

a. SEQ ID NO: 14, 15, 144, відповідно,

- b. SEQ ID NO: 14, 141, 16, відповідно;
- c. SEQ ID NO: 14, 142, 16, відповідно;
- d. SEQ ID NO: 14, 141, 144, відповідно; або
- e. SEQ ID NO: 14, 142, 144, відповідно.

5 43. Виділене антитіло згідно з варіантами реалізації 41 або 42, що відрізняється тим, що зазначене антитіло являє собою гуманізоване антитіло, антитіло Deimmunized™ або антитіло людини.

44. Виділене антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 41-43, що відрізняється тим, що зазначене антитіло відноситься до ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

10 45. Виділене антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації 41-44, що відрізняється тим, що зазначене антитіло містить заміну в Fc-області, яка модулює зв'язування антитіла з Fc-гама рецептором (FcγR) або з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), причому зазначена заміна включає заміну S267E/L328F, заміну E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, заміну V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S або заміну M252Y/S254T/T256E, де нумерація залишків наведена відповідно до EU Index.

15 46. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує VH або VL згідно з варіантом реалізації 41.

47. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти згідно з варіантом реалізації 46.

48. Клітина-господар, що містить вектор згідно з варіантом реалізації 47.

20 49. Виділене агоністичне антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) і варіабельну область важкого ланцюга (VH), що містить області, які визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, і області, які визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, що відрізняється тим, що

25 а. зазначена HCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6;

b. зазначена HCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 або 138;

c. зазначена HCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, 139 або 140;

d. зазначена LCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9;

30 e. зазначена LCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; і

f. зазначена LCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11;

g. за умови, що зазначене антитіло не містить VH, що містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 згідно SEQ ID NO: 6, 7 і 8, і VL, що містить амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3 згідно SEQ ID NO: 9, 10 і 11.

35 У даному винаході також запропоновані наступні варіанти реалізації

Z1. Зв'язуюча молекула, яка містить

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

40 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 27 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Z2. Зв'язуюча молекула, яка містить

(a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 26 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни; і/або

45 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність згідно з фігурою 26 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни.

Z3. Зв'язуюча молекула згідно з варіантом реалізації Z1 або варіантом реалізації Z2, яка зв'язується з CD134 людини.

50 Z4. Зв'язуюча молекула згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-3, причому зазначена зв'язуюча молекула не запобігає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L).

Z5. Зв'язуюча молекула згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-4, що відрізняється тим, що при концентрації, у якій зв'язування із зазначеною молекулою CD134 є насиченим, або в концентрації, що перевищує зазначену концентрацію, ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується не більше ніж на 50 % на T-клітинах, експресуючих CD134 людини.

Z6. Зв'язуюча молекула згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-5, що відрізняється тим, що при концентрації зазначеної зв'язуючої молекули 70 нМ ефект відносно зв'язування OX40L з CD134 зменшується на не більше ніж 70 % на T-клітинах, експресуючих CD134 людини.

Z7. Зв'язуюча молекула згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-6, що відрізняється тим, що зазначена зв'язуюча молекула зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 і/або SEQ ID NO: 92.

5 Z8. Зв'язуюча молекула згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-7, яка являє собою Fab-фрагмент, одноланцюговий Fv (scFv)-фрагмент або антитіло.

Z9. Антитіло згідно з варіантом реалізації Z8, яке являє собою гуманізоване антитіло або антитіло Deimmunized™ IgG, IgA, IgD, IgE або IgM, таке як антитіло IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

10 Z10. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує зв'язуючу молекулу або антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-9.

Z11. Носій або вектор для доставки генів, що містить нуклеїнову кислоту згідно з варіантом реалізації Z10.

Z12. Виділена або рекомбінантна клітина, або культура клітин *in vitro*, що містить нуклеїнову кислоту або вектор згідно з варіантом реалізації Z10 або Z11.

15 Z13. Спосіб одержання зв'язуючої молекули, що відрізняється тим, що в результаті зазначеного способу одержують зв'язуючу молекулу згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-8 або антитіло згідно з варіантом реалізації Z9.

Z14. Зв'язуюча молекула або антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-9 для застосування при лікуванні індивідуума, який потребує підсилення імунної відповіді.

20 Z15. Зв'язуюча молекула або антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-9 для застосування в запобіганні або лікуванні раку у індивідуума, який потребує такого запобігання або лікування.

Z16. Фармацевтична композиція, що містить зв'язуючу молекулу або антитіло згідно будь-якому з варіантів реалізації Z1-9 і фармацевтично прийнятний носій.

25 Даний винахід додатково проілюстрований наступними прикладами, які не слід тлумачити будь-яким способом, що може обмежити об'єм даного винаходу. Навпаки, слід розуміти, що можна вдатися до різних інших варіантів реалізації, модифікації і їх еквівалентів, які після прочитання опису в даній заявці можуть бути обрані фахівцем у даній області техніки без відходу від суті даного винаходу і/або об'єму прикладеної формули винаходу.

30 Приклади

Приклад 1. Одержання моноклональних антитіл миші проти CD134 (=OX40) людини

(а). Одержання клітин комах Sf9, експресуючих поверхневий CD134

кДНК, що кодує білок CD134 людини (GenBank № CAB 96543.1; див. SEQ ID NO:1), оптимізували для експресії в клітинах комах Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) і синтезували за допомогою GENEART, Regensburg, Germany (див. SEQ ID NO: 2; кат. № 0904551 (внутрішній код BC V076)). Дану кДНК субклонували в бакуловірусну трансферну плазмідую rVL1393 (набір для трансфекції BD, кат. № 560129; BD Biosciences). Потім клітини комах Sf9 (ATCC) котрансфікували трансферною плазмідую rVL1393, що містить кДНК, що кодує CD134 людини, разом із ДНК *VacuGold Vaculovirus DNA* (набір для трансфекції BD), і інкубували при температурі 27 °C протягом 4-5 днів. Після даного етапу котрансфекції супернатант відбирали, зберігали при температурі 4 °C і використовували для інфікування більшої кількості клітин комах Sf9 для ампліфікації вірусу. З даною метою клітини комах Sf9 трансфікували ампліфікованим рекомбінантним бакуловірусом і інкубували при температурі 27 °C протягом 3-5 днів. Дані клітини комах Sf9 збирали, промивали стерильним ФБР (фосфатним буферним розчином), розділяли на аліквоти об'ємом $\approx 2 \times 10^6$ клітин/250 мкл у ФБР і зберігали при температурі -80 °C для одержання лізатів клітин. Перед зберіганням експресію CD134 людини на поверхні трансфікованих клітин комах Sf9 підтверджували із застосуванням антитіл миші проти CD134 людини, кон'югованих з фікоеритрином (ФЕ), 1:10 (клон АСТ35; BD Biosciences), і методу проточної цитометрії.

50 (b). Імунізація і одержання моноклональних антитіл миші проти CD134 людини

Мишам BALB/c (самки, вік 6 тижнів; Charles River Laboratories) вводили підшкірну ін'єкцію ≈ 400 мкл лізатів клітин комах Sf9, трансфікованих CD134 людини (аліквота лізату клітин 250 мкл + 250 мкл повного ад'юванта Фрейнда; Sigma) у День 0. Аналогічні підшкірні ін'єкції із застосуванням лізатів клітин комах Sf9, трансфікованих CD134 людини, і неповного ад'юванта Фрейнда (Sigma) вводили в День 21 і День 42. Інтраперитонеальні бустер-ін'єкції лізатів клітин комах, трансфікованих CD134 людини (250 мкл/миша), без ад'юванта вводили в День 61 і в День 62. У день 65 спленоцити імунізованих мишей зливали із клітинами мієломи SP2/0 (DSMZ) із застосуванням стандартної гібридомної технології, спочатку описаної авторами Köhler and Milstein (Nature 1975; 256: p495-497). Коротко, імунізованих мишей вбивали, потім спленоцити виділяли із селезінки і промивали безсироватковим середовищем *opti-MEM I* із середовищем

GlutaMax (середовище SF; Invitrogen). Клітини мієломи SP2/0-Ag14, ріст яких був логарифмічним, промивали середовищем SF і додавали до спленоцитів з одержанням співвідношення спленоцитів і клітин мієломи 5:1. Клітини осаджували центрифугуванням, супернатант відкидали. Потім додавали по краплях 1 мл 37 % (об./ об.) розчину поліетиленгліколя 4000 (Merck) протягом 60 сек., після чого клітини інкубували протягом ще 60 сек. при температурі 37 °С. Додавали 8 мл середовища SF, після чого повільно додавали 5 мл середовища opti-MEM I з GlutaMax/10 % (об./ об.) ембріональною телячою сироваткою (ETC; Bodinco) при легкому перемішуванні. Через 30 хвилин при к.т. клітини осаджували центрифугуванням, промивали середовищем opti-MEM I з GlutaMax/10 % ETC для видалення залишкового поліетиленгліколя і, нарешті, висіювали в концентрації 10⁵ клітин/200 мкл на лунку в середовищі opti-MEM I з GlutaMax/10 % ETC/50x Hybri-Max™ аміноптерином (інгібітор синтезу ДНК de novo; Sigma). Починаючи із дня 7, селекційне середовище з аміноптерином поновлювали кожні 2-3 дня, і в день 14 середовище змінювали на середовище opti-MEM I з GlutaMax/10 % ETC. Гібридами, які продукували антитіла (класу IgG миші) проти CD134 людини (проводили скринінг загальноприйнятним методом ELISA і методиками проточної цитометрії із застосуванням злитого білка рекомбінантний CD134 людини:Fcγ людини (R&D Systems; див. приклад 11 (а) нижче) і бластів стимульованих ФГА(Roche) CD4 Т-клітин, експресуючих CD134 людини (див. приклад 2 (а) нижче) в якості мішеней, відповідно) експандували, заморожували і субклонували шляхом граничних розведень. Моноклональні антитіла, специфічні проти CD134 людини, очищували із застосуванням колонок з білком G (GE Healthcare), і в результаті одержували клон 12H3 і клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини.

Приклад 2. Характеристика клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини методом проточної цитометрії

(а). Експресія CD134 на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах людини

Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) людини від здоровіших донорів (була отримана інформована згода) виділяли в результаті центрифугування в градієнті щільності на приладі Lymphoprep (1,077 г/мл; Nycomed). Потім 1-2 × 10⁶ МКПК/мл у культуральному середовищі RPMI-1640 (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco), стимулювали 0, 0,1, 1,0 або 10,0 мкг/мл фітогемагглютиніну-М (ФГА-М; Roche) при температурі 37 °С/5 % CO₂ протягом 1-3 днів. Після культивування МКПК збирали і поміщали в концентрації 1 – 2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом фосфатний буферний сольовий розчин, що містить 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну (Sigma)/0,05 % NaN₃ (ФБР/БСА/NaN₃) з додаванням 10 % змішаної сироватки людини (ЗСЛ; блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з 10 мкг/мл комерційно доступного антитіла миші проти CD134 людини, клон АСТ35 (ізотип IgG1 миші; BD Biosciences, Alphen aan de Rijn, The Netherlands) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 антитілами кози проти IgG миші, кон'югованими з ФЕ (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:20 антитілами миші проти CD3 людини, кон'югованими із флуоресцеїн ізотіоціанатом (ФІТЦ) (BD Biosciences), для виявлення Т-лімфоцитів протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 1 (n=1 від кожного донора), нестимульовані/спочиваючі Т-лімфоцити людини, отримані з периферичної крові, не експресували будь-який CD134, однак ФГА дозозалежним чином стимулював експресію поверхневого CD134 CD3^{позитивними} Т-лімфоцитами людини. Після впливу 10 мкг/мл ФГА рівні експресії CD134 на активованих CD3^{позитивних} Т-лімфоцитах людини, як представлялося, досягали плато між "день 1" і "день 2", однак відсоток CD134 людини^{позитивних}/CD3^{позитивних} Т-лімфоцитів збільшувався залежно від часу протягом експерименту.

(b). Експресія CD134 на субпопуляції стимульованих ФГА CD4 Т-лімфоцитів людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 0 і 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 10 % ЗСЛ (блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з розведеним у співвідношенні 1:10 антитілом миші проти CD4 людини, кон'югованим з ФІТЦ (BD Biosciences), або з розведеним у співвідношенні 1:10 антитілом миші проти CD8 людини, кон'югованим з ФІТЦ (BD Biosciences), у комбінації з розведеним у співвідношенні 1:10 комерційно доступним клоном АСТ35 антитіла миші проти CD134 людини, кон'югованим з ФЕ (BD Biosciences), протягом 30 хвилин при

температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

5 Як показано на фігурі 2, експресія CD134 спостерігалася на стимульованих ФГА CD4^{позитивних} Т-лімфоцитах людини і не спостерігалася на спочиваючих CD4^{позитивних} Т-лімфоцитах людини. Незначна експресія CD134 була виявлена на активованих ФГА CD8^{позитивних} Т-лімфоцитах людини і не спостерігалася на спочиваючих CD8^{позитивних} Т-лімфоцитах людини (дані не показані).

10 (с). Зв'язування клонів 12Н3 і 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 10 мкг/мл протягом 2 днів; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 10 % ЗСЛ (блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6, 16,7, 50,0 мкг/мл комерційно доступного клону АСТ35 антитіла миші проти CD134 людини (ізотип IgG1 миші; BD Biosciences) і клону 12Н3 або клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 антитілами кози проти IgG миші, кон'югованими з ФЕ (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеним у співвідношенні 1:20 антитілом миші проти CD3 людини, кон'югованим з ФІТЦ (BD Biosciences), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С для виявлення Т-лімфоцитів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

25 Як показано на фігурі 3 (середнє ± СВ (стандартне відхилення); результати, отримані на зразках від двох донорів), клон АСТ35, клон 12Н3 і клон 20Н5 антитіла миші проти CD134 людини насичували поверхневі молекули CD134 людини на стимульованих ФГА CD3^{позитивних} Т-лімфоцитах у концентрації приблизно 5,0-10,0 мкг/мл. Із застосуванням зразків від даних двох донорів половинне максимальне зв'язування спостерігалася при концентрації ≈ 0,5 мкг/мл для клону 12Н3 антитіла миші проти CD134 людини і при концентрації ≈ 2,5 мкг/мл для клону АСТ35 і клону 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини.

30 (d). Зв'язування клонів 12Н3 і 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини на стимульованих ФГА CD 4-позитивних і CD 8-позитивних Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 20 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 10 % ЗСЛ (блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл контролю (ізотип IgG1к миші) (BD Biosciences) або з 20,0 мкг/мл клону 12Н3 або клону 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:100 антитілами кози проти IgG миші, кон'югованими з ФЕ (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4 °С з розведеним у співвідношенні 1:20 антитілом миші проти CD4 людини, кон'югованим з ФІТЦ (BD Biosciences), або з розведеним у співвідношенні 1:20 антитілом миші проти CD8 людини, кон'югованим з ФІТЦ (BD Biosciences), для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

50 Як показано на фігурі 4, клон 12Н3 і клон 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини демонстрували позитивне забарвлення на субпопуляції активованих CD4^{позитивних} Т-лімфоцитів людини і незначне позитивне забарвлення на субпопуляції активованих CD8^{позитивних} Т-лімфоцитів людини.

55 (e). Перехресна конкуренція немічених клонів 12Н3 і 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини з кон'югованими з ФЕ комерційними антитілами миші проти CD134 на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 10 мкг/мл або в концентрації 20 мкг/мл протягом 4 днів або протягом 1 дня, відповідно; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом

ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 10 % ЗСЛ (блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з 20 мкг/мл неміченого клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або з 10 мкг/мл неміченого клону 20E5 протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Клітини потім інкубували з розведеним у співвідношенні 1:20 комерційно доступним клоном АСТ35 (BD Biosciences) або клоном L106 (BD Biosciences; див. також патент Godfrey) антитіла миші проти CD134 людини, кон'югованим з ФЕ, протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування комерційно доступних кон'югованих з ФЕ антитіл проти CD134 вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 5, попередня інкубація з неміченим клоном антитіла 12H3 миші проти CD134 людини частково блокувала зв'язування комерційного клону L106 антитіла миші проти CD134 людини, кон'югованого з ФЕ, з CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах. Попередня інкубація з неміченим клоном антитіла 20E5 миші проти CD134 людини незначно блокувала зв'язування комерційного клону L106 антитіла миші проти CD134, кон'югованого з ФЕ, з CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах. Попередня інкубація з неміченими клоном 12H3 і клоном 20E5 антитіла миші проти CD134 людини не виявляла дії на зв'язування комерційного клону антитіла АСТ35 миші проти CD134 людини, кон'югованого з ФЕ, з CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах.

Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини специфічно розпізнає CD134 людини (частково блокуючи зв'язування клону L106) на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах і зв'язується (ii) з неідентичним епітопом на CD134 людини, який був розпізнаний комерційним клоном L106 антитіла миші проти CD134 людини. Дані результати також демонструють, що клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини (i) специфічно розпізнає CD134 людини (незначно блокуючи зв'язування клону L106) на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах і (ii) зв'язується з неідентичним епітопом, який був розпізнаний комерційним клоном L106 антитіла миші проти CD134 людини. Більше того, дані результати демонструють, що клон 12H3 і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнають епітопи CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, які відрізняються від епітопів, розпізнаваних комерційним клоном АСТ35 антитіла миші проти CD134 людини. Крім цього, дані результати демонструють, що клон 12H3 і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнають різні епітопи CD134 людини (що доведено частковим блокуванням у порівнянні з незначним блокуванням зв'язування L106, відповідно) на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах.

(f). Одночасне зв'язування рекомбінантного ліганда ОХ40 людини і клонів 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини.

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолодженій льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 10 % ЗСЛ (блокування Fcγ-рецепторів; BioWhittaker). Клітини інкубували з 10,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного ліганда ОХ40 людини (ОХ40L; R&D Systems) у комбінації з 50,0 мкг/мл антитіла проти полігістидину (IgG1 миші, клон AD1.1.10; R&D Systems) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:100 антитілами кози проти IgG миші, кон'югованими з ФІТЦ (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з 10,0 мкг/мл біотинильованого (із застосуванням N-гідроксисукцинімідо-біотину від Pierce) клону 12H3 або клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеним у співвідношенні 1:100 стрептавідином, кон'югованим з ФЕ (Jackson ImmunoResearch), протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували у 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування ОХ40L людини і антитіла проти CD134 людини вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 6, як клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, так і клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини зв'язується одночасно з ОХ40L людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини. Дані результати свідчать, що клон 12H3 і клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини не взаємодіють із епітопами в межах області зв'язування ОХ40L на рецепторі CD134

людини. Даний результат відрізняється від результату, отриманого на комерційно доступному клоні L106 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини (Stanford University/Godfrey патент EP 0 726 952 B1), який розпізнає епітоп у межах області зв'язування OX40L людини на рецепторах CD134 людини (Taylor and Schwarz. J Immunol Methods 2001; 255: 67-72; Kirin & La Jolla Institute/Croft патент WO 2007/062235 A2).

(g). Експресія CD134 на ефекторних і регуляторних Т-лімфоцитах людини після стимуляції стимулюючими бусинами з антитілами проти людини CD3/антитілами проти людини CD28

CD4 Т-лімфоцити людини виділяли із МКПК шляхом позитивної селекції із застосуванням антитіл миші проти CD4 людини, кон'югованих з мікробусинами (Miltenyi Biotec) і колонок VarioMACS™ Magnet/LS (Miltenyi Biotec). Потім дані CD4 Т-лімфоцити забарвлювали кон'югованими з ФІТЦ антитілами миші проти CD4 людини (Dako) і кон'югованими з ФЕ антитілами миші проти CD25 людини (BD Biosciences). CD4^{позитивні} /CD25^{негативні} традиційні ефекторні Т-лімфоцити (Teff) і CD4^{позитивні}/CD25^{high} регуляторні Т-лімфоцити (Treg) сортували із застосуванням клітинного сортеру для проточної цитометрії Altra (Beckman Coulter). У результаті забезпечували збагачення >95 % Teff і >95 % Treg. Teff і Treg поміщали в концентрації $2,5 \times 10^5$ клітин/мл у культуральне середовище RPMI-1640/GlutaMax (Gibco) з додаванням 0,02 мМ пірувату (Gibco), 100 Од./мл пеніциліну (Gibco), 100 мкг/мл стрептоміцину (Gibco) і 10 % інактивованої теплою ЗСЛ (ЗСЛи; від LMI). Потім клітини висіювали в концентрації $2,5 \times 10^4$ клітин/200 мкл/лунку на 96-ямкові планшети з опуклим дном (Greiner) і стимулювали стимулюючими бусинами з антитілами миші проти CD3 людини/антитілами миші проти CD28 людини (бусини CD3/CD28; Invitrogen) у концентрації 1 бусина/2 клітини в присутності 25 Од./мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини (Proleukin® від Novartis Pharmaceuticals UK Ltd) при температурі 37 °С/5 % CO₂ протягом 2-8 днів. Після культивування клітини збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/0,2 % БСА і одночасно забарвлювали розведеним у співвідношенні 1:50 кон'югованим з ФІТЦ антитілом миші проти CD4 людини (Dako), розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФЕ антитілом миші проти CD25 людини (BD Biosciences), розведеним у співвідношенні 1:50 кон'югованим з ECD™ антитілом миші проти CD3 людини (Beckman-Coulter), розведеними у співвідношенні 1:10 кон'югованими з PE-Cy™5 антитілами миші проти CD134 людини (клон АТС35; BD Biosciences) і розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з PE-Cy™7 антитілом миші проти CD127 людини (eBiosciences). Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 7 (n=1 від кожного донора), нестимульовані/спочиваючі (день 0) Teff людини і Treg людини, виділені з периферичної крові, не експерсували будь-який CD134, однак стимульовані бусинами CD3/CD28 Teff людини і Treg людини експерсували поверхневий CD134. Експресія CD134 на активованих Teff людини і Treg людини досягала максимуму через 2 дні культивування і зменшувалася через 5 і 8 днів культивування.

Приклад 3. Біологічна характеристика клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини

(a). Проліферація стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, після обробки клонами 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини.

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 0 і 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і суспендували в концентрації 2×10^6 клітин/мл у культуральному середовищі RPMI (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco). Клітини висіювали в концентрації $0,1 \times 10^6$ клітин/100 мкл/лунку (тобто 1×10^6 клітин/мл) на 96-ямкові планшети із плоским дном (Corning) і піддавали впливу 0, 0,025, 0,25, 2,5 або 25,0 мкг/мл клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або/і в комбінації з 0, 0,01, 0,1 або 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного OX40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °С/5 % CO₂ протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали із застосуванням набору для колориметричного аналізу (включення BrdU) Cell Proliferation ELISA™ (Roche) і зчитувального обладнання для аналізу ELISA (BioRad) при довжині хвилі А450 нм.

Як показано на фігурі 8 (середнє ± СВ, n=4 із застосуванням зразка, отриманого від одного донора), клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини і клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини дозозалежним чином стимулювали проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. Клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини стимулював проліферацію в концентрації 0,25, 2,5 і 25 мкг/мл. Клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини

стимулював проліферацію в концентрації 2,5 і 25 мкг/мл. Крім цього, ОХ40L людини також дозозалежним чином стимулював проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. ОХ40L людини стимулював проліферацію в концентрації 0,1 і 1,0 мкг/мл. Спочиваючі (без стимуляції ФГА) CD134 людини негати́вні Т-лімфоцити не демонстрували

5 будь-яких проліферативних відповідей після обробки клоном 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, клоном 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини (дані не показані).

Як показано на фігурі 9 (середнє \pm СВ, n=2 із застосуванням зразка, отриманого від одного донора), клон 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини (у концентрації 2,5 і 25 мкг/мл), клон 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини (у концентрації 2,5 і 25 мкг/мл) і ОХ40L людини (у концентрації 1,0 мкг/мл) стимулювали проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. У необробленому зразку (тільки середовище) або зразку, обробленому контролем, ізотипом IgG1к миші (у концентрації 2,5 і 25 мкг/мл; BD Biosciences), не спостерігалось будь-якого ефекту на проліферацію

10 стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. Комбінація клону 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в концентрації 2,5 і 25 мкг/мл (або в менших концентраціях; дані не показані) або клону 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в концентрації 2,5 і 25 мкг/мл (або в менших концентраціях; дані не показані) з ОХ40L людини в концентрації 1,0 мкг/мл (або у менших концентраціях; дані не показані) не продемонструвала будь-якої взаємної (тобто синергетичної або адитивної, або інгібуючої) дії на проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

(b). Проліферація Т-ефекторних і Т-регуляторних лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, стимульованих бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини, після обробки клоном 12Н3 і 20Е5 антитіла миші проти CD134 людини

CD4 Т-лімфоцити людини виділяли із МКПК шляхом негати́вної селекції із застосуванням коктейлю антитіл миші (BD Biosciences), спрямованих проти CD8 людини (клон RPA-T8), CD14 людини (клон M5E2), CD16 людини (клон 3G8), CD19 людини (клон 4G7), CD33 людини (клон P67.6), CD56 людини (клон B159) і CD235a людини (HIR2). Після інкубації з кон'югованими з Dynabeads® антитілами вівці проти IgG миші (Invitrogen) CD4 Т-лімфоцити, що незв'язалися

25 відбирали за допомогою прилада Dynal Magnetic Particle Concentrator, MPC™-6 (Invitrogen). З даних збагачених CD4 Т-лімфоцитів CD25^{high} Treg і CD25^{негати́вні} Teff виділяли методом MACS-сорти́нгу із застосуванням 10 мкл антитіл миші проти CD25 людини, кон'югованих з мікробусинами (Miltenyi Biotec)/107 клітин, і колонок MiniMACS™ Magnet/MS (колонок Miltenyi Biotec VarioMACS™ Magnet/LS (Miltenyi Biotec). У результаті забезпечували збагачення >90 % Teff і >90 % Treg. Teff і Treg поміщали в концентрації 0,25 \times 10⁶ клітин/мл у культуральне середовище RPMI-1640/GlutaMax (Gibco) з додаванням 0,02 мМ пірувату (Gibco), 100 Од./мл пеніциліну (Gibco), 100 мкг/мл стрептоміцину (Gibco) і 10 % ЗСЛі. Потім Teff і Treg висіювали в концентрації 2,5 \times 10⁴ клітин/200 мкл/лунку (тобто 0,125 \times 10⁶ клітин/мл) на 96-ямковій планшети з опуклим дном (Greiner) і стимулювали бусинами CD3/CD28 (Invitrogen) у концентрації 1

30 бусина/5 клітин з додаванням або без додавання 5,0 мкг/мл клону 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, 5,0 мкг/мл клону 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного ОХ40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5), комбінацією 5,0 мкг/мл клону 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з 1,0

35 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного ОХ40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину в молярному співвідношенні 1:5), або комбінацією 5,0 мкг/мл клону 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини і 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного ОХ40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину в молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °С/5 % CO₂ протягом 4 або 5 днів. Через 4 або 5 днів проліферацію клітин вимірювали із застосуванням включення 0,5 мкКи міченого тритієм тимідину (Perkin & Elmer) і β -лічильника (Canberra-Packard).

Як показано на фігурі 10 (середнє \pm СВ), хоча стимулюючі бусини CD3/CD28 самі по собі стимулювали значну проліферацію Teff, експресуючих CD134 людини (тобто середовище), клон 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або ОХ40L людини стимулювали

40 додаткову проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Teff, експресуючих CD134 людини. Клон 20Е5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини не стимулював додаткову проліферацію Teff, стимульованих бусинами CD3/CD28, експресуючих CD134 людини.

Як показано на фігурі 11 (середнє \pm СПС (стандартна помилка середнього) від 5 донорів), клон 12Н3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини і клон 20Е5 моноклонального

антитіла миші проти CD134 людини не викликав проліферації або викликав незначну проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючих CD134 людини, тоді як OX40L людини стимулював дуже сильну проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючих CD134 людини.

5 Як показано на фігурі 12A (середнє \pm СВ), клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в комбінації з OX40L людини не продемонстрував будь-якої взаємної (тобто інгібуючої, синергетичної або адитивної) дії на стимульовані бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючі CD134 людини. Більше того, клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в комбінації з OX40L людини не продемонстрував будь-якої взаємної (тобто інгібуючої, синергетичної або адитивної) дії на стимульовані бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючі CD134 людини (дані не показані).

10 Як показано на фігурі 12B (середнє \pm СВ), на відміну від дії (відсутність будь-якої дії), спостережуваної при проліферативних відповідях, опосередкованих OX40L людини, на стимульованих бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючих CD134 людини, клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини інтенсивно пригнічував проліферативні відповіді, опосередковані OX40L людини, на стимульованих бусинами CD3/CD28 Treg, експресуючих CD134 людини.

15 (с). Супресорна функція Т-регуляторних лімфоцитів, стимульованих бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини, експресуючих CD134 людини, після обробки клонами 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини

20 CD4 Т-лімфоцити людини виділяли із МКПК, і Teff і Treg збагачували, як описано в прикладі 3(b) вище. Teff і Treg поміщали в концентрації $0,25 \times 10^6$ клітин/мл у культуральне середовище RPMI 1640/GlutaMax (Gibco) з додаванням 0,02 мМ пірувату (Gibco), 100 Од./мл пеніциліну (Gibco), 100 мкг/мл стрептоміцину (Gibco) і 10 % ЗСЛі. Потім Teff висіювали в концентрації $2,5 \times 10^4$ клітин/200 мкл/лунку (тобто $0,125 \times 10^6$ Teff/мл) і спільно культивували з $2,5 \times 10^4$ супресивними Treg/200 мкл/лунку (тобто $0,125 \times 10^6$ Treg/мл; співвідношення Teff/Treg=1:1) на 96-лункових планшетах з опуклим дном (Greiner). Дані спільно культивовані культури Teff/Treg стимулювали бусинами CD3/CD28 (Invitrogen) у концентрації 1 бусина/10 клітин з додаванням або без додавання 5,0 мкг/мл клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, 5,0 мкг/мл клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини і 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного OX40L людини (в присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °C/5 % CO₂ протягом 5 днів. Через 5 днів проліферацію клітин вимірювали із застосуванням включення 0,5 мкКи міченого тритієм тимідину (Perkin & Elmer) і β -лічильника (Canberra-Packard).

25 Як показано на фігурі 13 (середнє \pm СВ), Treg людини пригнічували проліферативні відповіді Teff людини, стимульовані бусинами CD3/CD28 (тобто середовище). Дана супресивна функція Treg людини послаблялася в присутності клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або в присутності OX40L людини. Клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини не виявляв дії на супресивну функцію Treg людини.

30 Приклад 4. Молекулярногенетична характеристика клонів 20E5 і 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини

(а). Ізотипування і розщеплення за Едманом

35 Клас імуноглобуліну миші, ізотип і тип легкого ланцюга клонів 20E5 і 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, очищених за допомогою білка G, визначали із застосуванням набору IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotype Kit (Roche). Було показано, що як клон 20E5, так і клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини містять важкий ланцюг IgG1 і легкий ланцюг капа (к).

40 Після стандартного аналізу методом ДСН-ПААГ електрофорезу із застосуванням готового гелю і системи NuPage® Novex® (Invitrogen) в редуруючих умовах (ДТТ (дитіотреїтол) і нагрівання до 70 °C) клон 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини переносили на полівініліденфторидну (PDVF/Immobilon-P) мембрану для переносу (Millipore) і забарвлювали кумаси діамантовим блакитним (BioRad). Потім смуги важкого і легкого ланцюгів (50 кДа і 25 кДа, відповідно) вирізали з PVDF мембрани і використовували для аналізу методом розщеплення за Едманом (який проводили з підшию EuroSequence, Groningen, The Netherlands) для визначення N-термінальної амінокислотної послідовності. Результати для клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини представлені в SEQ ID NO.3 і SEQ ID NO.61. Були визначені одинадцять амінокислот N-кінця важкого ланцюга і 11 амінокислот N-кінця легкого ланцюга.

(b). ПЛР з ОТ

Клітини гібридами клону 20E5 і 12H3 збирали з культури клітин. Клітини промивали ФБР, розділяли на аліквоти, поміщали у флакони, що містять по 5×10^6 клітин, і зберігали у вигляді дебрису при температурі -80°C . Клітинний дебрис використовували для виділення РНК із застосуванням набору Rneasy Mini Isolation Kit (QIAGEN). Визначали концентрацію РНК (A260 нм) і РНК зберігали при температурі -80°C . Сумарний вихід виділеної РНК склав 27,3 мкг і 58,4 мкг для клону 20E5 і клону 12H3, відповідно (співвідношення A260/A280 в обох випадках 1,9). За допомогою зворотної транскриптази з 1 мкг РНК синтезували кДНК із застосуванням набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) і зберігали при температурі -20°C .

На підставі ізотипу (каппа/IgG1 миші) і аналізу розщеплення за Едманом клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини для ампліфікації V-областей клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини були розроблені наступні праймери:

№ праймера.* Послідовність** SEQ ID No. Напрямок Ген

201 GACAGTTGGTGCAGCATCAG 39 антизмістовий мкаппа

266 CACTGGATGGTGGGAAGATG 40 антизмістовий мкаппа

203 GGCCAGTGGATAGACAGATG 41 антизмістовий mIgG1

204 TGGACAGGGATCCAGAGTTC 42 антизмістовий mIgG1

259 GCGAAGTACAAYTNCARCARWSNNGG 43 змістовий 20E5HC

260 GCGTACAATTACARCARWSNNGGNCC 44 змістовий 20E5HC

265 GCGATATACARATGACNCARAC 45 змістовий 20E5LC

* номер згідно із внутрішньою системою кодування Bioseros;

** вироджені праймери: N=A, C, G або T, Y=C або T, R=A або G, W=A або T і S=G або C.

На підставі ізотипу (каппа/IgG1 миші) клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини і змістовних праймерів, що гібридизуються із кДНК, що кодує сигнальні пептиди миші (частково на підставі Antibody Engineering Volume 1 Kontermann, Roland E.; Dübel, Stefan (Eds.), Springer Lab Manuals, 2nd ed., 2010), для ампліфікації V-областей клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини були розроблені наступні праймери:

№ праймера.* Послідовність** SEQ ID No. Напрямок Ген

416 CAGTGGATAGACAGATGGGGG 46 антизмістовий mIgG1

394 ACTGGATGGTGGGAAGATGG 47 антизмістовий мкаппа

405 ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 48 змістовий сигнальний пептид

410 ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT 49 змістовий сигнальний пептид

389 ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA 50 змістовий сигнальний пептид

* номер згідно із внутрішньою системою кодування Bioseros;

** вироджені праймери: N=A, C, G або T, Y=C або T, R=A або G, W=A або T, і S=G або C, M=C або A і K=G або T.

Праймери 201 і 266 є антизмістовними, розробленими для гібридизації в межах константної області гена капа миші в положеннях 214-232 і 236-255, відповідно (на підставі облікового номера V00807 [версія V00807.1]).

Праймери 203 і 204 є антизмістовними, розробленими для гібридизації в межах константної області IgG1 миші в положеннях 115-134 і 221-240, відповідно (на підставі облікового номера J00453 [версія J00453.1]).

Праймери 259 і 260 є змістовними виродженими праймерами (виродження 512 і 256, відповідно) які гібридизуються на N-кінці (амінокислоти 1-8 і 2-9, відповідно) важкого ланцюга клону 20E5 антитіла миші проти CD134 людини на підставі розщеплення за Едманом.

Праймер 265 є змістовним виродженим праймером (виродження 16), який гібридизується на N-кінці (амінокислоти 1-7) легкого ланцюга клону 20E5 антитіла миші проти CD134 людини на підставі розщеплення за Едманом.

Праймер 416 є антизмістовним, розробленим для гібридизації в межах константної області IgG1 миші в положеннях 111-131 (на підставі облікового номера J00453 [версія J00453.1]).

Праймер 394 є антизмістовним, розробленим для гібридизації в межах константної області гена капа миші в положеннях 235-254 (на підставі облікового номера V00807 [версія V00807.1]).

Праймери 389, 405 і 410 є виродженими праймерами (виродження 2, 8 і 8, відповідно), які гібридизуються з послідовністю сигнального пептиду антитіла миші. Праймер 389 був розроблений для легкого ланцюга, праймери 405 і 410 – для важкого ланцюга.

Праймери 201, 266, 203, 204, 259, 260 і 265 використовували в різних комбінаціях для ампліфікації варіабельних областей клону 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, а праймери 416, 394, 405, 410 і 389 використовували в різних комбінаціях для ампліфікації варіабельних областей клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини. Численну кількість різних ПЛР проводили із застосуванням в якості матриці отриманих кДНК обох клонів.

ДНК-полімераза Accuprime™ Pfx (Invitrogen) використовували для ампліфікації варіабельних областей важкого і легкого ланцюга клону 20E5 і клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини. ПЛР-продукти аналізували на 1 % агарозному гелі. Продукти ПЛР-реакцій очищували на гелі і клонували у вектор pCR-Blunt II-TOPO® для аналізу послідовностей. У плазмідах, що містять ПЛР-вставку, клоновані вставки аналізували шляхом секвенування ДНК (аналіз проводили за допомогою ServisXS B.V., Leiden, The Netherlands або Macrogen, Amsterdam, The Netherlands) із застосуванням T7 для одержання консенсусної послідовності V-областей клонів 20E5 і 12H3 антитіла миші проти CD134 людини. Одинадцять реакцій інформативних послідовностей важкого ланцюга і 3 реакції інформативних послідовностей легкого ланцюга одержували для клону 20E5 антитіла миші проти CD134. П'ять реакцій інформативних послідовностей важкого ланцюга і 3 реакції інформативних послідовностей легкого ланцюга одержували для клону 12H3 антитіла миші проти CD134. На підставі даної інформації визначали консенсусні послідовності V-областей обох антитіл (див. SEQ ID NO. 4, 5, 12 і 13).

Приклад 5. Створення химерних IgG4/каппа людини і/або IgG1 /каппа людини (тобто заміна константних доменів миші константними доменами IgG/каппа людини) клонів 20E5 і 12H3 моноклонального антитіла людини проти CD134 людини

На підставі визначених V-областей миші (див. приклад 4 (b) вище) було проведено конструювання клонів 20E5 і 12H3 антитіла миші проти CD134 для одержання версій химерного антитіла людини. Із цією метою в GENEART (Regensburg, Germany) були замовлені послідовності кДНК, оптимізовані для клітин CHO (див. SEQ ID NO. 20 (кодує важкий ланцюг IgG4 клону 20E5 химерного антитіла людини), SEQ ID NO. 21 (кодує легкий ланцюг к клону 20E5 химерного антитіла людини), SEQ ID NO. 22 (кодує важкий ланцюг IgG1 клону 20E5 химерного антитіла людини), SEQ ID NO. 23 (кодує важкий ланцюг IgG4 клону 12H3 химерного антитіла людини) і SEQ ID NO. 24 (кодує легкий ланцюг к клону 12H3 химерного антитіла людини), що кодують сигнальний пептид миші, за яким слідує варіабельна область легкого ланцюга, приєднана до константної області капа людини, або за яким слідує варіабельна область важкого ланцюга, приєднана до константної області IgG людини. Дане конструювання було проведено для обох антитіл; для клону 20E5 варіабельна область важкого ланцюга була приєднана до константної області IgG4 людини або IgG1 людини; для клону 12H3 варіабельна область важкого ланцюга була приєднана до константної області IgG4 людини. Із застосуванням підходящих рестрикційних ферментів отримані кДНК субклонували в отримані із пкДНК3.1 плазміди експресії. Химерні антитіла експресували із застосуванням системи експресії FreeStyle™ MAX CHO (клітини CHO-S) (Invitrogen). Експресовані антитіла очищували із застосуванням колонок для афінної хроматографії з білком А (GE Healthcare). Химерні амінокислотні послідовності див. в SEQ ID NO. 25, 26, 27, 28 і 29.

Приклад 6. Характеристика зв'язування клону 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4/каппа людини і/або IgG1/каппа людини проти CD134 людини

(а). Характеристика зв'язування клону 20E5 моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини на CD4-позитивних Т-лімфоцитах, стимульованих ФГА, експресуючих CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолодженій льодом ФБР/БСА/NaN₃. Клітини інкубували з 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6, 16,7, 50,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:50 кон'югованими з ФІТЦ антитілами миші проти IgG4 людини (Sigma) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФЕ антитілом миші проти CD4 людини (BD Biosciences) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини насичував поверхневі молекули CD134 людини на стимульованих ФГА CD4^{позитивних} Т-лімфоцитах у концентрації приблизно 5,0-10,0 мкг/мл (дані не показані). Половинне максимальне зв'язування спостерігалось при концентрації клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини $\approx 1,0$ мкг/мл (дані не показані).

(b). Зв'язування клону 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини на стимульованих ФГА CD 4-позитивних і CD 8-позитивних Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (у концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃. Клітини інкубували з додаванням або без додавання 20,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4 °С з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG людини (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФІТЦ антитілом миші проти CD4 людини (BD Biosciences) або з розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФІТЦ антитілом миші проти CD8 людини (BD Biosciences) для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрував позитивне забарвлення на субпопуляції активованих ФГА CD4-позитивних Т-лімфоцитів людини і незначне позитивне забарвлення на субпопуляції активованих ФГА CD8-позитивних Т-лімфоцитів людини (дані не показані).

(с). Зв'язування клону 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини на CD4-позитивних і CD8-позитивних Т-лімфоцитах, стимульованих стимулюючими бусинами з антитілами проти людини CD3/антитілами проти людини CD28, експресуючих CD134 людини

Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) людини від здоровіших донорів (була отримана інформована згода) виділяли в результаті центрифугування в градієнті щільності на приладі Lymphoprep (1,077 г/мл; Nycomed). Потім 1×10^6 МКПК/мл у культуральному середовищі RPMI-1640 (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco), стимулювали стимулюючими бусинами з антитілами миші проти CD3 людини/антитілами миші проти CD28 людини (бусини CD3/CD28; Invitrogen) у концентрації 1 бусина/4 клітини при відсутності або в присутності 25 Од./мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини (PeproTech) при температурі 37 °С/5 % CO₂ протягом 1 дня. Після культивування МКПК збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃. Клітини інкубували з додаванням або без додавання 20,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG людини (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4 °С з розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФІТЦ антитілом миші проти CD4 людини (BD Biosciences) або з розведеним у співвідношенні 1:10 кон'югованим з ФІТЦ антитілом миші проти CD8 людини (BD Biosciences) для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували у 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 14, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрував позитивне забарвлення на субпопуляції CD4^{позитивних} Т-лімфоцитів людини, активованих бусинами CD3/CD28, і незначне позитивне забарвлення на субпопуляції CD8^{позитивних} Т-лімфоцитів, активованих бусинами CD3/CD28. Будь-якої очевидної дії при додаванні рекомбінантного ІЛ-2 людини не спостерігалось.

Приклад 7. Біологічна характеристика клону 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4/каппа людини проти CD134 людини

(а). Проліферація стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, після обробки клоном 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини

Були отримані стимульовані ФГА (10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і суспендували в концентрації 2×10^6 клітин/мл у культуральному середовищі RPMI (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco). Клітини висіювали в концентрації $0,1 \times 10^6$ клітин/100 мкл/лунку (тобто 1×10^6 клітин/мл) на 96-ямковій планшеті із плоским дном (Corning) і піддавали впливу 25,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або 25,0 мкг/мл контрольного антитіла IgG4к людини проти CD40 людини (PG102; PanGenetics) або 1,0

мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного OX40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °C/5 % CO₂ протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали із застосуванням набору для колориметричного аналізу (включення BrdU) Cell Proliferation ELISA™ (Roche) і зчитувального обладнання для аналізу ELISA (BioRad) при довжині хвилі A450 нм.

Як показано на фігурі 15 (середнє ± СВ), клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (л20E5) і OX40L людини стимулювали проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. Відсутність обробки (тільки середовище) або обробка контрольним антитілом IgG4к людини проти CD40 людини (лIgG4) не виявляли будь-якої дії на проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

(b). Проліферація стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, після обробки клоном 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини в комбінації з рекомбінантним OX40L людини

Були отримані стимульовані ФГА (10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини. Клітини збирали і суспендували в концентрації 2×10^6 клітин/мл у культуральному середовищі RPMI (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco). Клітини висіювали в концентрації $0,1 \times 10^6$ клітин/100 мкл/лунку (тобто 1×10^6 клітин/мл) на 96-лункових планшетах із пласким дном (Corning) і піддавали впливу 0, 0,025, 0,25, 2,5 або 25,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або/і в комбінації з 0, 0,01, 0,1, або 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного OX40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °C/5 % CO₂ протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали із застосуванням набору для колориметричного аналізу (включення BrdU) Cell Proliferation ELISA™ (Roche) і зчитувального обладнання для аналізу ELISA (BioRad) при довжині хвилі A450 нм.

Як показано на фігурі 16 (середнє ± СВ), клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (л20E5) і OX40L людини дозозалежним чином стимулювали проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. Клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини залежно від донора стимулював проліферацію в концентрації 2,5 або 25 мкг/мл (донор 1) або в концентрації 0,25, 2,5 і 25 мкг/мл (донор 2). Крім цього, OX40L людини залежно від донора стимулював проліферацію в концентрації 0,1 або 1,0 мкг/мл (донор 1) або в концентрації 0,01, 0,1 і 1,0 мкг/мл (донор 2).

Як показано на фігурі 17 (середнє ± СВ), комбінація клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (л20E5) у концентрації 2,5 і 25 мкг/мл (або в менших концентраціях; дані не показані) з OX40L людини у концентрації 0,1 і 1,0 мкг/мл (або в менших концентраціях; дані не показані) не продемонструвала будь-якої взаємної (тобто синергетичної або адитивної, або інгібуючої) дії на проліферацію стимульованих ФГА Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

(c). Проліферація стимульованих стимулюючими бусинами з антитілами проти CD3 людини/антитілами проти CD28 людини Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, після обробки клоном 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини

Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) людини від здоровіших донорів (була отримана інформована згода) виділяли в результаті центрифугування в градієнті щільності на приладі Lymphoprep (1,077 г/мл; Nycomed). Потім МКПК висіювали в концентрації $0,1 \times 10^6$ клітин/100 мкл/лунку (тобто 1×10^6 клітин/мл) на 96-лункових планшетах із пласким дном (Corning) у культуральному середовищі RPMI-1640 (Gibco), що містить 10 % ембріональну телячу сироватку (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину (Gibco), і стимулювали стимулюючими бусинами з антитілами миші проти CD3 людини/антитілами миші проти CD28 людини (бусини CD3/CD28; Invitrogen) у концентрації 1 бусина/2 клітини при відсутності або в присутності 25 Од./мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини (PeproTech) при температурі 37 °C/5 % CO₂. Через 1 день або через 2 дні (з додаванням і без додавання інтерлейкіну-2) стимульовані бусинами CD3/CD28 Т-лімфоцити, експресуючі CD134 людини, піддавали впливу 25,0 мкг/мл клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або 1,0 мкг/мл міченого полігістидином рекомбінантного OX40L людини (у присутності антитіла миші проти полігістидину, R&D Systems, у молярному співвідношенні 1:5) при температурі 37 °C/5 % CO₂ протягом 6 днів або протягом 5 днів, відповідно. Клітини, які початково стимулювали комбінацією бусин CD3/CD28 з рекомбінантним інтерлейкіном-2 людини, повторно стимулювали за 1 день до вимірювання проліферації клітин 25 Од./мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини. Через 6 днів або через 5 днів впливу клону 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або OX40L людини проліферацію клітин вимірювали із застосуванням

набору для колориметричного аналізу (включення BrdU) Cell Proliferation ELISA™ (Roche) і зчитувального обладнання для аналізу ELISA (BioRad) при довжині хвилі 450 нм.

Як показано на фігурі 18 (середнє \pm СВ, $n=3$ із застосуванням зразка, отриманого від одного донора), хоча стимулюючі бусини CD3/CD28 самі по собі (тобто середовище) стимулювали значну проліферацію Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (л20E5) і OX40L людини стимулювали додаткову проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини. Додавання інтерлейкіну-2, як представляється, підсилювало тільки базову (тобто викликану середовищем) проліферацію стимульованих бусинами CD3/CD28 Т-лімфоцитів, експресуючих CD134 людини.

(d). Імуностимулюючі відповіді у мавп макак-резус після обробки клонами 12H3 і 20E5 (химерного) антитіла людини проти CD134 людини

Нелюдиноподібних приматів мавпи макаки-резус можна імунізувати білком вірусу імунодефіциту мавп, gp130, як описано Weinberg із співавт. (J Immunother 2006; 29: 575-585).

Очікується, що в дренальних лімфатичних вузлах імунізованих мавп, які одержували клони 12H3 і 20E5 антитіла людини (наприклад, химерного або гуманізованого або деімунізованого; наприклад, підкласу IgG1 або IgG4 людини) проти CD134 людини, буде спостерігатися збільшення лімфатичних вузлів у порівнянні з контрольними імунізованими мавпами. Очікується, що у тварин, які одержували клони 12H3 або 20E5 антитіла миші або гуманізованого антитіла, у порівнянні з контролем буде спостерігатися збільшення титрів gp130-специфічних антитіл і збільшення відповідей Т-клітин, які довго живуть. Не повинно спостерігатися будь-яких виражених ознак токсичності у мавп, які одержували лікування.

Приклад 8. Характеристика доменів і епітопів CD134 людини, розпізнаваних клонами 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини

(a). Зв'язування клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з невідновленим і відновленим рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини (вестерн-блотинг).

По 1300 або 650 нг/доріжку (для фарбуванн кумаси діамантовим блакитним) або 250 нг/доріжку (для вестерн-блотинга) рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fc γ людини (IgG1) (R&D Systems) аналізували методом електрофорезу з застосуванням 4-12 % Tris-Bis гелей і електродного буфера MOPS (Invitrogen) у різних нередукуючих і редукуючих умовах (див. фігуру 19-A) у готовій LDS-ПААГ денатуруючій системі для електрофорезу NuPage® Novex®. Потім рекомбінантний злитий білок CD134 людини:Fc γ людини забарвлювали кумаси діамантовим блакитним (BioRad) або переносили на полівініліденфторидну (PDVF) мембрану для переносу (Millipore). Після блокування ФБР/0,05 % Твін 20/1 % БСА фракція V (Roche) протягом 20 хв. при к.т. PDVF мембрани інкубували з 100 нг/мл клону 12H3 або клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 1 години при к.т. Паралельно 100 нг/мл контрольного антитіла миші ізотипу IgG1к (BD Biosciences) використовували в якості негативного контролю. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 визначали зв'язування клону 12H3 або клону 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з розведеними у співвідношенні 1:5000 кон'югованими з пероксидазою хрину Fc γ -специфічними антитілами кози проти імуноглобулінів миші (Jackson ImmunoResearch) протягом 1 години при к.т. з наступним додаванням готового до застосування розчину субстрату ТМБ (Sigma) для колориметричного виявлення.

Як показано на фігурі 19-B, рекомбінантний злитий білок CD134 людини:Fc γ людини у нередукуючих (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї, умова а і b, відповідно) умовах демонстрував молекулярну масу \approx 130-140 кДа. В нередукуючих умовах без нагрівання (умова а) спомтерігали дві смужки у безпосередній близькості, що свідчить про те, що фракція рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fc γ людини не повністю денатурувала/розгорнулася. В нередукуючих умовах, з нагріванням (умова b) спостерігалася одна смужка, що свідчить про той факт, що рекомбінантний злитий білок CD134 людини:Fc γ людини повністю денатурував/розгорнувся. Рекомбінантний злитий білок CD134 людини:Fc γ людини в редукуючих умовах (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї, умова с і d, відповідно) призводив до появи смуг з \approx 110 кДа (умова с) і \approx 60-65 кДа (умова d). Перше спостереження свідчило про неповне відновлення рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fc γ людини, останнє спостереження свідчило про повне відновлення/розщеплення дисульфідних містків, що поєднують два Fc γ -фрагменти, отримані від IgG1 людини, у межах кожної молекули рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fc γ людини.

Як показано на фігурі 19-C, як клон 12H3, так і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини розпізнавали рекомбінантний злитий білок CD134 людини:Fc γ людини в нередукуючих

умовах (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї, умова а і b, відповідно) з переважно ≈ 130 кДа. Навпаки, клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини продемонстрував тільки незначне зв'язування з рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини в редукуючих умовах (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї, умова с і d, відповідно), тоді як клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини продемонстрував сильне зв'язування з рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини в редукуючих умовах (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї, умова с і d, відповідно).

Дані результати демонструють, що клон 12H3 і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини специфічно розпізнають CD134 людини. Більше того, дані результати демонструють, що клон 12H3 і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнають різні епітопи CD134 людини, що доводиться відповідним незначним зв'язуванням (клон 12H3) у порівнянні із сильним зв'язуванням (клон 20E5) з рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини в редукуючих умовах (і денатуруючих умовах LDS з термічною денатурацією і без неї). Дані результати свідчать, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини розпізнавав епітоп на CD134 людини, який є не чутливим до денатурації (LDS і теплова обробка) і чутливим до відновлення (тобто до розщеплення ДТТ дисульфідного містка (містків) - найбільш ймовірно, що перебувають у цистеїн-багатих доменах (CRD)). Дані результати свідчать, що клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини розпізнає епітоп на CD134 людини, який є не чутливим до денатурації (LDS і теплова обробка) і не чутливим до відновлення (тобто до розщеплення ДТТ дисульфідного містка (містків) - найбільш ймовірно, що перебувають в CRD).

(b). Зв'язування клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з повнорозмірною конструкцією CD134 людини і різними усіченими конструкціями CD134 людини, які експресуються на клітинній лінії 293-F (доменне картування)

З метою аналізу однозначної специфічності клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини визначали розташування епітопу (епітопів), розпізнаваних клонами 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, методом доменного картування. Здатність клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини зв'язуватися з усіченими конструкціями CD134 людини, які експресуються на поверхні клітин 297-F (отриманих з НЕК), визначали в результаті аналізу FACS.

На підставі літературних даних (Swiss-Prot: P43489.1; Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683; Bodmer et al. Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26; Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; публікація патенту США № 2011/0028688 A1) були встановлені цистеїн-багаті домени (CRD) і шарніроподібна структура в позаклітинній області CD134 людини. CRD кодуються CRD1, CRD2, (усіченим) CRD3, (усіченим) CRD4 (див. фігуру 20). CRD містять топологічно різні типи модулів, які називають А-модуль і В-модуль (див. також фігуру 20). А-модулі являють собою С-подібні структури, а В-модулі являють собою S-подібні структури. Типовий CRD зазвичай складається з А1-В2-модулів або А2-В1-модулів (або, менше часто, відмінної пари модулів, наприклад, А1-В1) з 6 консервативними залишками цистеїна, де число позначає кількість дисульфідних містків у межах кожного модуля (див. також фігуру 20). Як показано на фігурі 20, були отримані і експресовані 5 різних конструкцій CD134 людини: (1) конструкція повнорозмірного CD134 людини, яка починається з N-термінального CRD1 (тобто А1-В2-модуль CRD1 охоплює амінокислоти 29-65), внаслідок цього позначена як "CRD1" і утримує амінокислоти 1-277 (див. SEQ ID NO. 1), (2) конструкція "CRD2", яка починається з N-термінального CRD2 (тобто А1-В2-модуль CRD2 охоплює амінокислоти 66-107) і містить амінокислоти 66-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO. 30), (3) конструкція "CRD3", яка починається з N-термінального CRD3 (тобто А1-В1-модуль CRD3 охоплює амінокислоти 108-146 (відповідно до Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330) або усічений А 1-модуль CRD3 охоплює амінокислоти 108-126 (відповідно до Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683)) і містить амінокислоти 108-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO. 31), (4) конструкція "CRD4", яка складається з N-термінального CRD4 або В1-модуля субдомену CRD3/А1-модуля усіченого CRD4 (тобто А1-В1-модуль CRD4 охоплює амінокислоти 127-167 (Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або комбінація (не показана на фігурі 20) В1-модуля субдомену CRD3 з А1-модулем усіченого CRD4 охоплює амінокислоти 127-146 з амінокислотами 147-167, відповідно (Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330)), і містять амінокислоти 127-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO. 32), і (5) конструкція "усічений (ус) CRD4", яка складається з N-термінального В1-модуля усіченого CRD4 або субдомену CRD4 (тобто А1-модуль усіченого CRD4 охоплює амінокислоти 147-167 (Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-

1330) або В1-модуль субдомену CRD4 (не показаний на фігурі 20; Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) охоплює амінокислоти 147-167) і містить амінокислоти 147-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO. 33). Дані 5 конструкцій CD134 людини були отримані шляхом ПЛР-складання із застосуванням ДНК-полімерази Accuprime™ Pfx (Invitrogen) і праймерів, представлених у наступній таблиці:

№ праймера.* Послідовність SEQ ID No. Напрямок Ген
 362 CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG 51 змістовий CD134 лідерний
 363 AGAATTCTTATTAGATCTTGGCCA 55 антизмістовий CD134 кінцевий
 364 ACTGTCACTGGACCCTGCGGTCCC 52 змістовий CRD2
 365 GGGACCGCAGGGTCCAGTGACAGT 53 антизмістовий CRD2
 366 ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT 54 змістовий CRD3
 367 AGCCCTGCACSTTCCAGTGACAGT 56 антизмістовий CRD3
 368 ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCT 57 змістовий CRD4
 369 AGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT 58 антизмістовий CRD4
 370 ACTGTCACTGGATGCACCCTGGCT 59 змістовий CRD4 усічений
 371 AGCCAGGGTGCATCCAGTGACAGT 60 антизмістовий CRD4 усічений

* № праймера відповідно до внутрішньої системи кодування Biosceros

Коротко, кДНК, що кодує амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, і кДНК, що кодує амінокислоти 66-277 CD134 людини, ампліфікували із застосуванням пари праймерів 362/365 і 364/363, відповідно, у реакції ПЛР із повнорозмірним CD134 людини в якості матриці. Потім конструкцію "CRD2" одержували із застосуванням даних двох продуктів ПЛР шляхом ПЛР-складання із застосуванням пари праймерів 362/363. кДНК конструкцію, що кодує, "CRD2", субклонували в плазміді експресії, отримані із кДНК3.1, із застосуванням підходящих сайтів рестрикції. Аналогічно, конструкцію "CRD3" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, приєднані до амінокислот 108-277 CD134 людини), конструкцію "CRD4" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, приєднані до амінокислот 127-277) і конструкцію "усіченого CRD4" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, приєднані до амінокислот 147-277) одержували і субклонували в плазмідах експресії, отриманих із кДНК3.1, із застосуванням відповідних праймерів, представлених у вищевказаній таблиці. Більше того, повнорозмірний CD134 людини (SEQ ID NO. 1) також повторно клонували в плазмідах експресії, отриманих із кДНК3.1.

Із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Invitrogen) клітини 293-F FreeStyle™ (Invitrogen) тимчасово трансфікували 5 отриманими варіантами CD134 людини. Через 48-72 год. аналізували поверхневу експресію CD134 людини на трансфікованих клітинах у ході аналізу FACS. Із цією метою трансфіковані клітини збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃. Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Паралельно 20,0 мкг/мл контрольного антитіла ізотипу IgG1к миші (BD Biosciences) використовували в якості негативного контролю. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG миші (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2% формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 21, як клон 12H3, так і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини розпізнавали повнорозмірний (позначений як конструкція "CRD1") CD134 людини на трансфікованих клітинах 293-F, тоді як клон 12H3 і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини не продемонстрували зв'язування на неправильно трансфікованих клітинах 293-F. Більше того, клони 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини розпізнавали усічені варіанти CD134 людини, у яких були відсутні CRD1 і CRD1-CRD2 (позначені як конструкція "CRD2" і конструкція "CRD3", відповідно) на трансфікованих клітинах 293-F. Навпаки, зв'язування клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини з усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній А1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначено як конструкція "CRD4"), було дуже слабким, і зв'язування клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини з усіченим варіантом CD134 людини, у якій були відсутні А1-модуль CRD1-CRD 2-усіченого CRD3-А1-модуль субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або, в якості альтернативи, А1-В1 модуль CRD1-CRD2-CRD3 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначено як конструкція "усCRD4"), повністю було відсутнє, тоді як клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини продемонстрував сильне зв'язування з усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній А1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначено як конструкція "CRD4") і з усіченим варіантом CD134 людини,

у якій були відсутні A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3-A1-модуль субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або, в якості альтернативи, A1-B1-модуль CRD1-CRD2-CRD3 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначено як конструкція "усCRD4").

5 Дані результати демонструють, що клони 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини специфічно розпізнають CD134 людини (трансфекція повнорозмірним CD134 людини в порівнянні з неправильною трансфекцією). Більше того, дані результати демонструють, що клони 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнають різні епітопи CD134 людини, що доводиться відповідною відсутністю зв'язування (із застосуванням клону 12H3) у порівнянні із сильним зв'язуванням (із застосуванням клону 20E5) з усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначено як конструкція "CRD4"), і з усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3-A1-модуль субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або, в якості альтернативи, A1-B1-модуль CRD1-CRD2-CRD3 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначено як конструкція "усCRD4"). Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, не розпізнає епітоп CD134 людини в CRD1 і CRD2, і клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, не розпізнає епітоп CD134 людини в CRD1, CRD2 і усіченому A1-модулі CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або, в якості альтернативи, A1-B1 модулі CRD1-CRD2-CRD3 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330). Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнає лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD3 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з амінокислотною послідовністю 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAQTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) на позаклітинному CD134 людини, або амінокислотна послідовність 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAQTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) утворює частину для зв'язування з нелінійним/конформаційним епітопом в A1-модулі усіченого CRD3/A1-B1-модулі CRD4 (у відповідності з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, у шарніроподібній структурі, з амінокислотною послідовністю 108-214 (див. SEQ ID NO: 35) на позаклітинному CD134 людини. Дані результати демонструють, що клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнає лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD4 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330), і, можливо, у шарніроподібній структурі, з амінокислотною послідовністю 147-214 (SEQ ID NO:36) на позаклітинному CD134 людини.

Із застосуванням кристалографічного дослідження Compaan et al. (Structure 2006; 14: 1321-1330) нещодавно виявили критичне залучення CRD1, CRD2 (особливо петлі A1 і залишків, розташованих безпосередньо за нею) і CRD3 (у першу чергу, петлі A1) на CD134 людини в ході взаємодії з лігандом OX40 (CD252)/CD134 (=OX40). Дане відкриття добре узгоджується з результатами, отриманими авторами даного винаходу, що (1, див. вище) клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, не розпізнає епітоп CD134 людини в A1-модулі CRD1, CRD2 і усіченого CRD3-A1 модулі субдомена CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або, в якості альтернативи, в A1-B1-модулі CRD1-CRD2-CRD3 (відповідно до визначення Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330) на позаклітинному CD134 людини, і (2, див. вище) клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини зв'язується одночасно з OX40L людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини. Дані результати свідчать, що клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини розпізнає епітоп на CD134 людини, який не був критично залучений у взаємодію CD134 людини з OX40L людини. Більше того, результати, отримані авторами даного винаходу, згідно з якими (1, див. вище) клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнає лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD3 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з амінокислотною послідовністю 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAQTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) на позаклітинному CD134 людини, або амінокислотна послідовність 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAQTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) утворює частину для зв'язування з нелінійним/конформаційним епітопом в A1-модулі усіченого CRD3/ A1-B1-модулі CRD4 (у відповідності з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, у шарніроподібній структурі, з амінокислотною послідовністю 108-214 (див. SEQ ID NO: 35) на позаклітинному CD134 людини, і (2, див. вище) клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини зв'язується одночасно з OX40L людини на стимульованих ФГА Т-лімфоцитах, експресуючих CD134 людини, підтверджують припущення,

що епітоп (як описане вище) на CD134 людини, який був розпізнаний клоном 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, не був критично залучений у взаємодію CD134 людини з OX40L людини.

5 (с). Картування епітопа (1) клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини із застосуванням пептиду, отриманого з CD134 людини, і методу ELISA

3 метою наступного аналізу однозначної специфічності клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини визначали розташування епітопа, розпізнаваного клоном 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, шляхом картування епітопа. Здатність клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини зв'язуватися з пептидом, отриманим з CD134 людини, який відповідав амінокислотній послідовності A1-модуля усіченого CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), визначали методом ELISA.

10 На 96-ямковій планшеті для аналізу методом ELISA із пласким дном (Corning) наносили по 10 нг/лунку пептиду, отриманого з CD134 людини, (синтезований Pepscan Presto, Lelystad, The Netherlands), який відповідав амінокислотній послідовності A1-модуля усіченого CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (див. SEQ ID NO: 38), або по 10 нг/лунку контрольного пептиду, отриманого з фібронектину людини (синтезований Pepscan Presto, Lelystad, The Netherlands), який відповідав амінокислотній послідовності структурного домену екстра-типу III (див. SEQ ID NO: 37) у ФБР протягом ночі при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 планшети блокували ФБР/0,05 % Твін 20/1 % БСА фракція V (Roche) протягом 1 години при к.т. Потім планшети інкубували з 0, 0,00005-50,0 (10-кратні розведення в блокувальному буфері) мкг/мл клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини або контрольного антитіла миші ізотипу IgG1к (BD Biosciences) протягом 1 години при к.т. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 визначали зв'язування антитіл з розведеними у співвідношенні 1:5000 кон'югованими з пероксидазою хрину Fcy-специфічними антитілами кози проти IgG миші (Jackson ImmunoResearch) протягом 1 години при к.т. з наступним додаванням готового до застосування розчину субстрату ТМБ (Invitrogen) для колориметричного виявлення. Після додавання 1 М H₂SO₄ оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 450 нм (опорна довжина хвилі 655 нм) із застосуванням зчитувального обладнання для мікропланшетів (BioRad).

20 Як показано на фігурі 23A (n=1), клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язується з пептидом, отриманим з CD134 людини, тоді як контрольне антитіло миші ізотипу IgG₁к не демонструвало зв'язування з пептидом, отриманим з CD134 людини. Як клон 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, так і контрольне антитіло ізотипу IgG₁к не демонстрували зв'язування з контрольним пептидом, отриманим з фібронектину людини.

25 Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини специфічно розпізнає епітоп на CD134 людини (пептид, отриманий з CD134 людини, у порівнянні з контрольним пептидом, отриманим з фібронектину людини). Більше того, дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, як представляється, розпізнає лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з амінокислотною послідовністю 108-146 (тобто 39-мірний пептид RCRAQTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN; див. SEQ ID NO: 38) на позаклітинному CD134 людини.

30 (d) Картування епітопа (2) клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини із застосуванням технології картування епітопа CLIPS від Pepscan

35 Технологію картування епітопа CLIPS від Pepscan (Lelystad, The Netherlands) можна застосовувати для визначення епітопів, розпізнаваних клонами 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини. Дана технологія CLIPS дозволяє визначати лінійні, конформаційні епітопи, епітопи переривчастого типу і комплексні епітопи, що включають димерні або мультимерні білкові комплекси. З даною метою в якості білка-мішені використовують лінійну амінокислотну послідовність CD134 людини = OX40 (SEQ ID NO: 1).

40 Приклад 9. Характеристика доменів і епітопів CD134 людини, розпізнаваних клонами 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4/каппа i/або IgG1/каппа людини проти CD134 людини

45 (а). Зв'язування клонів 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к i/або IgG1к людини проти CD134 людини з повнорозмірною конструкцією CD134 людини і з різними усіченими конструкціями CD134 людини, які експресуються на клітинній лінії 293-F (доменне картування)

3 метою аналізу однозначної специфічності клонів 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к і/або IgG1к людини проти CD134 людини визначали розташування епітопа (епітопів), розпізнаваних клонами 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к і/або IgG1к людини проти CD134 людини, методом доменного картування. Здатність клонів 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к і/або IgG1к людини проти CD134 людини зв'язуватися з усіченими конструкціями CD134 людини (див. приклад 8 (b) вище), який експресується на поверхні клітин 297-F (отриманих з НЕК), визначали в результаті аналізу FACS.

Із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Invitrogen) клітини FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) тимчасово трансфікували 5 отриманими варіантами CD134 людини (див. вище). Через 48-72 год. аналізували експресію поверхневого CD134 людини на трансфікованих клітинах у ході аналізу FACS. Із цією метою трансфіковані клітини збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃. Клітини інкубували з додаванням або без додавання 20,0 мкг/мл клонів 12H3 і 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к і/або IgG1к людини проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG людини (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 22, як клон 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к і IgG1к людини проти CD134 людини, так і клон 20E5 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрували характеристики зв'язування з різними усіченими конструкціями CD134 людини на трансфікованих клітинах, які були ідентичні характеристикам зв'язування їх відповідних аналогів батьківських клонів 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини (див. приклад 8 (b) вище; для порівняння, див. фігуру 22 у порівнянні з фігурою 21).

(b). Картування епітопа клону 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини із застосуванням пептиду, отриманого з CD134 людини, і методу ELISA

3 метою додаткового аналізу однозначної специфічності клону 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини розташування епітопа, розпізнаваного клонем 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини, визначали шляхом картування епітопа. Здатність клону 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини зв'язуватися з пептидом, отриманим з CD134 людини, який відповідає амінокислотній послідовності A1-модуля усіченого CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), визначали методом ELISA.

На 96-ямокві планшети для аналізу ELISA із пласким дном (Corning) наносили по 10 нг/лунку пептиду, отриманого з CD134 людини (синтезований Pepscan Presto, Lelystad, The Netherlands), який відповідає амінокислотній послідовності A1-модуля усіченого CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (див. SEQ ID NO. 38), або по 10 нг/лунку контрольного пептиду, отриманого з фібронектину людини (синтезованого Pepscan Presto, Lelystad, The Netherlands), який відповідає амінокислотній послідовності екстра-типу III структурного домену (див. SEQ ID NO. 37) у ФБР протягом ночі при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20, планшети блокували ФБР/0,05 % Твін 20/1 % БСА фракція V (Roche) протягом 1 години при к.т. Потім планшети інкубували з 0, 0,00005-50,0 (10-кратні розведення в блокувальному буфері) мкг/мл клону 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або контрольного антитіла IgG4к людини проти CD40 людини (Bioscult) протягом 1 години при к.т. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 визначали зв'язування антитіл з розведеними у співвідношенні 1:5000 кон'югованими з пероксидазою хрину Fcγ-специфічними антитілами кози проти людини IgG (Jackson ImmunoResearch) протягом 1 години при к.т. з наступним додаванням готового до застосування розчину субстрату ТМБ (Invitrogen) для колориметричного виявлення. Після додавання 1 М H₂SO₄ оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 450 нМ (опорна довжина хвилі 655 нМ) із застосуванням зчитувального обладнання для мікропланшетів (BioRad).

Як показано на фігурі 23В (n=1), клон 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язується з пептидом, отриманим з CD134 людини, тоді як контрольне антитіло IgG4к людини проти CD40 людини не демонструвало зв'язування з пептидом, отриманим з CD134 людини. Як клон 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини, так і контрольне антитіло IgG4к

людини проти CD40 не демонстрували зв'язування з контрольним пептидом, отриманим з фібронектину людини.

Дані результати демонструють, що клон 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини специфічно розпізнає епітоп на CD134 людині (пептид, отриманий з CD134 людини, у порівнянні з контрольним пептидом, отриманим з фібронектину людини). Більше того, дані результати демонструють, що клон 12H3 химерного моноклонального антитіла IgG4к людини проти CD134 людини, як представляється, розпізнає лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з амінокислотною послідовністю 108-146 (тобто 39-мірний пептид RCRAQTQLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN; див. SEQ ID NO: 38) на позаклітинному CD134 людини.

Приклад 10. Створення клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4/каппа проти CD134 людини

На підставі визначених V-областей миші (див. приклад 2 (b) вище) клонів 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини були отримані гуманізовані версії антитіла.

Гуманізовані послідовності варіабельної області легкого ланцюга і гуманізовані послідовності варіабельної області важкого ланцюга клонів 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини одержували із застосуванням технології PDL (яку здійснювали за допомогою Panaroma Research Institute, Sunnyvale, CA, USA). Гуманізовані амінокислотні послідовності варіабельної області легкого ланцюга і варіабельної області важкого ланцюга див. в SEQ ID NO: 62 (20E5-VL1), 63 (20E5-VL2), 64 (20E5-VH1), 65 (20E5-VH2), 66 (20E5-VH3), and SEQ ID NO. 67 (12H3-VL1), 68 (12H3-VL2), 69 (12H3-VH1), 70 (12H3-VH2), 71 (12H3-VH3).

Після даного конструювання в GENEART (Regensburg, Germany) замовляли послідовності кДНК, оптимізовані для *Cricetulus griseus* (див. SEQ ID NO: 72, 73, 74 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного важкого ланцюга IgG4 клону 20E5, тобто VH1, VH2, VH3, відповідно), SEQ ID NO. 75, 76 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного легкого ланцюга к клону 20E5, тобто 20E5_VL1, 20E5_VL2, відповідно), SEQ ID NO: 77, 78, 79 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного важкого ланцюга IgG4 12H3, тобто VH1, VH2, VH3, відпов.) і SEQ ID NO. 80, 81 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного легкого ланцюга к клону 12H3, тобто VL1, VL2, відпов.)), що кодують сигнальний пептид, за яким іде гуманізована варіабельна область важкого ланцюга, приєднана до константної області IgG4 людини, або за яким іде гуманізована варіабельна область легкого ланцюга, приєднана до константної області капа людини: (1) для експресії гуманізованих версій клону 20E5 антитіла проти CD134 людини для обох гуманізованих важкого і легкого ланцюга використовували сигнальний пептид важкого ланцюга імуноглобуліну миші і (2) для експресії гуманізованих версій клону 12H3 антитіла проти CD134 людини для гуманізованого важкого ланцюга використовували сигнальний пептид важкого ланцюга імуноглобуліну людини, і для гуманізованого легкого ланцюга використовували сигнальний пептид ланцюга капа імуноглобуліну людини. Також усі гуманізовані антитіла експерсували у вигляді стабілізованих молекул IgG4 людини відповідно до Angal et al. (Mol. Immunol., Vol. 30, No. 1, pp. 105-108, 1993). Із застосуванням підходящих рестрикційних ферментів отримані кДНК субклонували в плазмідах експресії, отриманих із пкДНК3.1.

Гуманізовані версії клону 20E5 антитіла проти CD134 людини експерсували із застосуванням системи експресії FreeStyle™ MAX CHO (Life Technologies). Гуманізовані версії клону 12H3 антитіла проти CD134 людини експерсували із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Отримані гуманізовані антитіла очищували із застосуванням колонок для афінної хроматографії з білком А (GE Healthcare). Таким чином, були отримані шість очищених гуманізованих версій клону антитіла 20E5, тобто 20E5_VL1VH1, 20E5_VL1VH2, 2-E5_VL1VH3, 20E5_VL2VH1, 20E5_VL2VH2 і 20E5_VL2VH3, і були отримані шість очищених гуманізованих версій клону антитіла 12H3, тобто 12H3_VL1VH1, 12H3_VL1VH2, 12H3_VL1VH3, 12H3_VL2VH1, 12H3_VL2VH2 і 12H3_VL2VH3.

Гуманізовані амінокислотні послідовності див. в SEQ ID NO: 82, 83, 84 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного важкого ланцюга IgG4 клону 20E5, тобто VH1, VH2, VH3, відпов.), SEQ ID NO. 85, 86 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного легкого ланцюга (клону 20E5, тобто VL1, VL2, відпов.), SEQ ID NO. 87, 88, 89 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного важкого ланцюга IgG4 клону 12H3, тобто VH1, VH2, VH3, відпов.) і SEQ ID NO. 90, 91 (кодують гуманізовані версії повнорозмірного легкого ланцюга (клону 12H3, тобто VL1, VL2, відпов.).

Приклад 11. Характеристика зв'язування клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4/каппа проти CD134 людини

(а). Зв'язування клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини (ELISA)

На 96-ямковій планшети для аналізу ELISA із пласким дном (Corning) наносили по 50 нг/лунку рекомбінантного злитого білка CD134 людини:Fc γ людини (IgG1) (R&D Systems) у ФБР протягом 5 ночі при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 планшети блокували ФБР/0,05 % Твін 20/1 % БСА фракція V (Roche) протягом 1 години при к.т. Потім 10 планшети інкубували з 0, 0,0003-20,0 (3-кратне розведення в блокувальному буфері) мкг/мл батьківського клону 120E5 або 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клону 120E5 або клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 і шести версій клонів 120E5 або 12H3 15 гуманізованих антитіл IgG4к проти CD134 людини протягом 1 години при к.т. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 визначали зв'язування антитіл з розведеними у співвідношенні 1:5000 кон'югованими з пероксидазою хрину антитілами кози проти імуноглобулінів миші (Fc γ -специфічними) (Jackson ImmunoResearch) або з розведеними у 20 співвідношенні 1:4000 кон'югованими з пероксидазою хрину антитілами кози проти імуноглобулінів людини (к-специфічними) (Southern Biotech) протягом 1 години при к.т. з 15 наступним додаванням готового до застосування розчину субстрату ТМБ (Invitrogen) для колориметричного виявлення. Після додавання 1 М H₂SO₄ оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 450 нм (опорна довжина хвилі 655 нм) із застосуванням зчитувального обладнання для мікропланшетів (BioRad).

20 Як показано на фігурі 28 (n=2), клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість версій клону 20E5 гуманізованого антитіла IgG4к проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язуються з рекомбінантним CD134 людини. Клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізовані версії 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2 і 20E5_VL2VH3 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини 25 продемонстрували ідентичні криві титрування, що свідчить про ідентичність їхньої афінності зв'язування з антигеном CD134 (половинне максимальне зв'язування EC₅₀ \approx 100 нг/мл), тоді як гуманізовані версії 20E5_VL1H1 і 20E5_VL1H2 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, продемонстрували не суттєво меншу афінність зв'язування (EC₅₀ \approx 150 нг/мл). У зв'язку з використанням вторинних антитіл, специфічних до різних ланцюгів імуноглобуліну (тобто антитіла миші виявляли за допомогою антитіл, специфічних до ланцюга Fc γ , тоді як химерне антитіло людини і гуманізовані антитіла виявляли за допомогою антитіл, специфічних до ланцюга к), провести порівняння між кривою титрування (дані не показані) 30 батьківського клону 20E5 антитіла миші проти CD134 людини і кривими титрування химерного антитіла людини і гуманізованих версій клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини було неможливе.

35 Як показано на фігурі 29 (n=2), клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к людини проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язуються з рекомбінантним CD134 людини. Клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 40 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини –12H3_VL1H1, 12H3_VL1H2, 12H3_VL1H3, 12H3_VL2H1, 12H3_VL2VH2 і 12H3_VL2VH3 – продемонстрували неідентичні криві титрування, які свідчать, що всі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини продемонстрували незначно більшу афінність зв'язування з антигеном CD134 (EC₅₀ \approx 50 нг/мл), ніж клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини (EC₅₀ \approx 100 нг/мл). У 45 зв'язку з використанням вторинних антитіл, специфічних до різних ланцюгів імуноглобуліну (тобто антитіла миші виявляли за допомогою антитіл, специфічних до ланцюга Fc γ , тоді як химерне антитіло людини і гуманізовані антитіла виявляли за допомогою антитіл, специфічних до ланцюга к), провести порівняння між кривою титрування (дані не показані) батьківського клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і кривими титрування химерного антитіла 50 людини і гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини було неможливе.

(b). Конкуренція клону 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з біотинильованим батьківським клоном 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини за зв'язування з рекомбінантним злитим білком CD134 людини:Fc γ людини (ELISA).

55 Перед проведенням конкурентного вимірювання методом ELISA визначали значення EC₅₀ біотинильованого (із застосуванням N-гідроксисукцинімідо-біотину від Pierce) батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини (див. нижче опис методу), яке, як було виявлено, становило приблизно 20 нг/мл (див. фігуру 30, n=3). Потім досліджували 60 заміну біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134

людини і його ідентифікованої концентрації EC_{50} неміченим батьківським клоном 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клоном 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і шістьма гуманізованими версіями клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини.

5 На 96-ямковій планшети для аналізу ELISA із пласким дном (Corning) наносили по 50 нг/лунку рекомбінантного злитого білка CD134 людини: Fc γ людини (IgG1) (R&D Systems) у ФБР протягом ночі при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 планшети блокували ФБР/0,05 % Твін 20/1 % БСА фракція V (Roche) протягом 1 години при к.т. Потім планшети інкубували з 0, 0,001 – 60,0 (3-кратне розведення в блокувальному буфері) мкг/мл неміченого батьківського клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини або шістьма гуманізованими версіями клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини в комбінації з 20 нг/мл (EC_{50}) біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 1 години при к.т. Після тривалого промивання у ФБР/0,05 % Твін 20 визначали зв'язування біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з розведеним у співвідношенні 1:5000 кон'югованим з пероксидазою хрину стрептавідином (Jackson ImmunoResearch) протягом 1 години при к.т. з наступним додаванням готового до застосування розчину субстрату ТМБ (Invitrogen) для колориметричного виявлення. Після додавання 1 М H_2SO_4 оптичну щільність вимірювали при довжині хвилі 450 нм (опорна довжина хвилі 655 нм) із застосуванням зчитувального обладнання для мікропланшетів (BioRad).

20 Як показано на фігурі 31 (n=2), немічений батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 неміченого химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрували ідентичне заміщення біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, яке свідчило, що батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрували ідентичну афінність зв'язування з антигеном CD134 (половинне максимальне заміщення або інгібування (IC_{50}) біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в концентрації \approx 750 нг/мл). Усі шість немічених гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини – 12H3_VL1H1, 12H3_VL1H2, 12H3_VL1H3, 12H3_VL2H1, 12H3_VL2H2 і 12H3_VL2H3 – демонстрували аналогічне заміщення біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, яке свідчать, що всі шість немічених гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини демонстрували аналогічну афінність зв'язування з антигеном CD134 ($IC_{50} \approx$ 250-300 нг/мл).

35 Дані результати демонструють, що всі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини продемонстрували більшу афінність зв'язування з антигеном CD134, ніж батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини.

40 (с). Зв'язування клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з повнорозмірною конструкцією CD134 людини, яка експресується на клітинній лінії 293-F (FACS)

45 З метою детального аналізу зв'язування клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини зв'язуючи ємність клонів 20E5 і 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з поверхневим повнорозмірним CD134 людини на клітинних лініях 293-F (стабільні трансфектанти) визначали методом проточної цитометрії, а також порівнювали з характеристиками зв'язування їх відповідних аналогів батьківських антитіл миші проти CD134 людини.

Повнорозмірний CD134 людини (SEQ ID NO. 1) повторно клонували в плазмідах експресії, отриманих із пкДНК3.1 (див. приклад 11 (d) нижче). Дану плазмиду повнорозмірного CD134 людини трансфікували в клітини 293-f FreeStyle™ (Life Technologies) із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Клітини, стабільно трансфіковані повнорозмірним CD134 людини (клон № 5 з високим рівнем експресії поверхневого CD134 і клон № 23 із середнім рівнем експресії поверхневого CD134; див. фігуру 32) вибирали із застосуванням 125 мкг/мл G418 (Gibco), збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 50 мкг/мл очищених IgG людини (Sigma; блокування Fc γ -рецепторів). Клітини інкубували з 0, 0,005-50 мкг/мл (10-кратні розведення у ФБР/БСА/NaN₃; усі версії клону 20E5) або 0,002-20 мкг/мл (10-кратні розведення у ФБР/БСА/NaN₃; усі версії клону 12H3) батьківського клону 20E5 або клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клону 20E5 або клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і шести гуманізованих версій клону 20E5 або клону 12H3 IgG4к антитіла проти CD134 людини протягом 30 хвилин при

температурі 4 °С. Паралельно контрольне антитіло миші ізо типу IgG1к (BD Biosciences; 50,0 або 20,0 мкг/мл) і контрольне химерне антитіло людини ізо типу IgG4к (клон ch5D12 від PanGenetics; 50,0 або 20,0 мкг/мл) використовували в якості негативних контролів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG миші (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) або з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG людини (Fcγ-специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2 % формальдегіду у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 33 (клон № 5 клітин, трансфікованих повнорозмірних CD134 людини, з високим рівнем експресії поверхневого CD134; n=1), батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язуються з CD134 людини, який експресується на поверхні клітини. Батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізовані версії 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2 і 20E5_VL2VH3 клону 20E5 антитіла IgG4к людини проти CD134 продемонстрували аналогічні криві титрування, що свідчить, що їхні афінності зв'язування з антигеном CD134 є аналогічними, тоді як гуманізовані версії VL1H1 і VL1H2 клону 20E5 антитіла IgG4к людини проти CD134, як представляється, продемонстрували незначно меншу афінність зв'язування.

Як показано на фігурі 34 (клон № 5 клітин, трансфікованих повнорозмірним CD134 людини, з високим рівнем експресії поверхневого CD134; n=2), батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язуються з CD134 людини, який експресується на поверхні клітини. Батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізовані версії 12H3_VL2H1 і 12H3_VL2VH3 клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини продемонстрували ідентичні криві титрування, що свідчить про ідентичність їх афінності зв'язування з антигеном CD134, тоді як гуманізовані версії 12H3_VL1H1, 12H3_VL1H2, 12H3_VL1H3 і 12H3_VL2H2 клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, продемонстрували незначно більшу афінність зв'язування.

Як показано на фігурі 35 (клон № 23 клітин, трансфікованих повнорозмірним CD134 людини, із середнім рівнем експресії поверхневого; n=2), батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини дозозалежним чином і специфічно зв'язуються з CD134 людини, який експресується на поверхні клітини. Батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини продемонстрували аналогічні криві титрування, що свідчить, що їх афінності зв'язування з антигеном CD134 є аналогічними (EC₅₀ > 200 нг/мл), тоді як усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини – 12H3_VL1H1, 12H3_VL1H2, 12H3_VL1H3, 12H3_VL2H1, 12H3_VL2VH2 і 12H3_VL2VH3, як представляється, продемонстрували більшу афінність зв'язування (EC₅₀ < 200 нг/мл).

Дані результати проточної цитометрії, узяті разом, демонструють, що гуманізовані версії 20E5_VL1H3, 20E5_VL2H1, 20E5_VL2VH2, 20E5_VL2VH3 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини, батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини і клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини продемонстрували аналогічну афінність зв'язування з антигеном CD134, тоді як гуманізовані версії 20E5_VL1H1 і 20E5_VL1H2 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, продемонстрували незначно меншу афінність зв'язування з антигеном CD134. Крім цього, дані результати демонструють, що всі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини продемонстрували більшу афінність зв'язування з антигеном CD134, ніж батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини.

(d). Зв'язування клонів 12H3 і 20E5 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з повнорозмірною конструкцією CD134 людини і з різними усіченими конструкціями CD134 людини, експресованими на клітинній лінії 293-F (доменне картування FACS).

3 метою аналізу однозначної специфічності клонів 12H3 і 20E5 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини, визначали розташування епітопа, розпізнаваного клонами 12H3 і 20E5 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини, методом доменного картування. Здатність клонів 12H3 і 20E5 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини зв'язуватися з конструкціями усіченого CD134 людини, експресованими на поверхні клітин 297-F (отриманих з НЕК), визначали в ході аналізу методом проточної цитометрії.

На підставі літературних даних (Swiss-Prot: P43489.1; Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683; Bodmer et al. Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26; Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; публікація патенту США № 2011/0028688), були встановлені цистеїн-багаті домени (CRD) і шарніроподібна структура в позаклітинній області CD134 людини. CRD кодуються CRD1, CRD2, (усіченим) CRD3, (усіченим) CRD4 (див. фігуру 20). CRD містять топологічно різні типи модулів, які називають А-модуль і В-модуль (див. також фігуру 20). А-модулі являють собою С-подібні структури, а В-модулі являють собою S-подібні структури. Типовий CRD зазвичай складається з А1-В2-модулів або А2-В1-модулів (або, менше часто, відмінної пари модулів, наприклад, А1-В1) з 6 консервативними залишками цистеїну, де число позначає кількість дисульфідних містків у межах кожного модуля (див. також фігуру 20). Як показано на фігурі 20, були отримані і експресовані 3 різні конструкції CD134 людини: (1) конструкція повнорозмірного CD134 людини, яка починається з N-термінального CRD1 (тобто А1-В2-модуль CRD1 охоплює амінокислоти 29-65), внаслідок цього позначена як "CRD1" і утримуюча амінокислоти 1-277 (див. SEQ ID NO. 1), (2) конструкція "CRD3", яка починається з N-термінального CRD3 (тобто А1-В1-модуль CRD3 охоплює амінокислоти 108-146 (відповідно до Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330) або А1-модуль усіченого CRD3 охоплює амінокислоти 108-126 (відповідно до Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683)), і містять амінокислоти 108-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO: 31), (3) конструкція "CRD4", яка складається з N-термінального В1-модуля CRD4 або субдомени CRD3/ А1-модуля усіченого CRD4 (тобто А1-В1-модуль CRD4 охоплює амінокислоти 127- 167 (Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або комбінація (не показана на фігурі 20) В1-модуля субдомени CRD3 з А1-модулем усіченого CRD4 охоплює амінокислоти 127-146 з амінокислотами 147-167, відповідно (Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330)), і містять амінокислоти 127-277, приєднані до амінокислот 1-28 сигнального пептиду (див. SEQ ID NO: 32). Дані 3 конструкції CD134 людини були отримані шляхом ПЛП-складання із застосуванням ДНК-полімерази Accuprime™ Pfx (Invitrogen) і праймерів, представлених у таблиці 2.

Таблиця 2

№ праймера.*	Послідовність	SEQ ID №	Напрямок	Ген
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	змістовий	CD134 лідерний
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGGCCA	55	антизмістовий	CD134 кінцевий
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	змістовий	CRD3
367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	антизмістовий	CRD3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCT	57	змістовий	CRD4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	антизмістовий	CRD4

* № праймера, відповідно до внутрішньої системи кодування Bioseros

Коротко, кДНК, що кодують амінокислоти, 1-28 сигнального пептиду, і кДНК, що кодують амінокислоти 66-277 CD134 людини, ампліфікували із застосуванням пари праймерів 362/367 і 366/363, відповідно, у реакції ПЛП із повнорозмірним CD134 людини в якості матриці. Потім конструкцію "CRD3" одержували із застосуванням даних двох продуктів ПЛП шляхом ПЛП-складання із застосуванням пари праймерів 362/363. кДНК конструкцію, що кодує, "CRD3", субклонували в плазмідах експресії, отриманих із кДНК3.1, із застосуванням підходящих сайтів рестрикції. Аналогічно конструкцію "CRD4" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, приєднані до амінокислот 127-277) одержували і субклонували в плазмідах експресії, отриманих із кДНК3.1, із застосуванням відповідних праймерів, представлених у вищевказаній таблиці. Більше того, повнорозмірний CD134 людини (SEQ ID NO: 1) також повторно клонували в плазмідах експресії, отриманих із кДНК3.1.

Із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Life Technologies) клітини 293-F FreeStyle™ (Life Technologies) тимчасово трансфікували 3 отриманими варіантами CD134 людини. Через 48 год. аналізували експресію поверхневого CD134 людини на трансфікованих

клітинах в ході аналізу FACS. Із цією метою трансфіковані клітини збирали і поміщали в концентрації $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в охолоджений льодом ФБР/БСА/ NaN_3 з додаванням 50 мкг/мл очищених IgG людини (Sigma; блокування Fc γ рецепторів). Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл батьківських клонів 12H3 і 20E5 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з 20,0 мкг/мл клонів 12H3 і 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини, з 20,0 мкг/мл шести гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини і з 20,0 мкг/мл гуманізованої версії 20E5_VL1VH1 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Паралельно 20,0 мкг/мл контрольного антитіла миші ізо типу IgG1к (BD Biosciences) і 20,0 мкг/мл контрольного химерного антитіла людини ізо типу IgG4к (клон ch5D12 від PanGenetics) використовували в якості негативних контролів. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/ NaN_3 клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG миші (Fc γ специфічними) (Jackson ImmunoResearch) або з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG людини (Fc γ -специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/ NaN_3 клітини інкубували з розведеними у співвідношенні 1:200 кон'югованими з ФЕ антитілами кози проти IgG миші (Fc γ -специфічними) (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/ NaN_3 клітини фіксували в 2% формальдегіді у ФБР/БСА/ NaN_3 протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування антитіл вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 36, батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини розпізнавали повнорозмірний (позначений як конструкція "CRD1") CD134 людини і усічений варіант CD134 людини, у яких були відсутні CRD1-CRD2 (позначені як конструкція "CRD3"), на трансфікованих клітинах 293-F, тоді як батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини не продемонстрували зв'язування на неправильно трансфікованих клітинах 293-F. Навпаки, зв'язування батьківського клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усіх шести гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини з усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначений як конструкція "CRD4"), було дуже слабким або було відсутнє, тоді як батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини продемонстрував сильне зв'язування з даним усіченим варіантом CD134 людини, у якій був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначений як конструкція "CRD4") на трансфікованих клітинах 293-F, що підтверджує, що дані останні клітини 293-F експерсували дану усічену версію поверхневого CD134.

Як показано на фігурі 37, батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізована версія 20E5_VL1VH1 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини розпізнавали повнорозмірний (позначений як конструкція "CRD1") CD134 людини, усічений варіант CD134 людини, у яких були відсутні CRD1-CRD2 (позначений як конструкція "CRD3"), і усічений варіант CD134 людини, у якому був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначений як конструкція "CRD4"), на трансфікованих клітинах 293-F, тоді як батьківський клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізована версія 20E5_VL1VH1 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини не продемонстрували зв'язування на хибно трансфікованих клітинах 293-F.

Дані результати демонструють, що батьківські клони 12H3 і 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клони 12H3 і 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини, усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини і гуманізована версія 20E5_VL1VH1 клону антитіла IgG4к проти CD134 людини специфічно розпізнає CD134 людини (порівняння трансфекції повнорозмірним CD134 людини з неправильною трансфекцією). Більше того, дані результати демонструють, що клони 12H3 і 20E5 антитіла проти CD134 людини, як представляється, розпізнають різні епітопи CD134 людини, що доводиться відповідною відсутністю зв'язування (із застосуванням клону 12H3) у порівнянні із сильним зв'язуванням (із застосуванням клону 20E5) з усіченим варіантом CD134 людини, у якому був відсутній A1-модуль CRD1-CRD2-усіченого CRD3 (позначений як конструкція "CRD4"). Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, не розпізнають епітоп CD134 людини

на CRD1 і CRD2. Клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і гуманізована версія VL1VH1 клону 20E5 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, не розпізнають епітоп CD134 людини в A1-модулі CRD1, CRD2 і усіченого CRD3 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683). Дані результати демонструють, що клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і усі шість гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, розпізнають лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі усіченого CRD3 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з амінокислотною послідовністю 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAGTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) на позаклітинному CD134 людини, або амінокислотна послідовність 108-126 (тобто 19-мірний пептид RCRAGTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID NO: 34) утворює частину для зв'язування з нелінійним/конформаційним епітопом на A1-модулі усіченого CRD3/A1-B1-модулі CRD4 (у відповідності з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, у шарніроподібній структурі, з амінокислотною послідовністю 108-214 (див. SEQ ID NO: 35) на позаклітинному CD134 людини. Дані результати демонструють, що клон 20E5 антитіла миші проти CD134 людини, клон 20E5 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і клон 20E5_VL1VH1 гуманізованого антитіла IgG4к проти CD134 людини, як представляється, розпізнають лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-B1-модулі CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, у шарніроподібній структурі, з амінокислотною послідовністю 127-214 (SEQ ID NO: 92) на позаклітинному CD134 людини.

(е). Конкуренція клону 12H3 гуманізованого моноклонального антитіла IgG4к проти CD134 людини з біотинильованим батьківським клоном 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини за зв'язування з поверхневим CD134 людини на клоні № 5 стабільно трансфікованою клітинною лінією 293-F (FACS)

Перед проведенням вимірювання конкуренції методом проточної цитометрії визначали EC₅₀ біотинильованого (із застосуванням N-гідроксисукцинімідо-біотину від Pierce) батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини (див. нижче опис методу), у результаті якого було виявлено, що значення EC₅₀ становить приблизно 700 нг/мл (див. фігуру 38, n=2). Потім досліджували заміщення біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини у виявленій концентрації EC₅₀ неміченим батьківським клоном 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клоном 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і шістьма гуманізованими версіями клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини.

Повнорозмірний CD134 людини (SEQ ID NO1) повторно клонували в плазмідах експресії, отриманих із пкДНК3.1 (див. приклад 11 (с) вище). Дану плазмиду повнорозмірного CD134 людини трансфікували в клітини 293-F FreeStyle™ (Life Technologies) із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 (Life Technologies). Клітини, стабільно трансфіковані повнорозмірним CD134 людини (клон № 5 з високим рівнем експресії поверхневого CD134, див. фігуру 32), відбирали із застосуванням 125 мкг/мл G418 (Gibco), збирали і поміщали в концентрації 1-2 × 10⁶ клітин/мл в охолодженій льодом ФБР/БСА/NaN₃ з додаванням 50 мкг/мл очищених IgG людини (Sigma; блокування Fcγ-рецепторів). Клітини інкубували з 0,003-50,0 (5-кратне розведення у ФБР/БСА/NaN₃) неміченого батьківського клону 12H3 антитіла миші проти CD134 людини, клону 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини і шести гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини в комбінації з 700 нг/мл (EC₅₀) біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ визначали зв'язування біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини з розведеним у співвідношенні 1:200 кон'югованим з ФЕ стрептавідином (Jackson ImmunoResearch) протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Після тривалого промивання у ФБР/БСА/NaN₃ клітини фіксували в 2% формальдегіді у ФБР/БСА/NaN₃ протягом 30 хвилин при температурі 4 °С. Зв'язування біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини вимірювали із застосуванням методу проточної цитометрії (FACSCalibur; BD Biosciences).

Як показано на фігурі 39 (n=2), немічений батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і немічений клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрували ідентичне заміщення біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, яке свідчило, що батьківський клон 12H3

антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини демонстрували ідентичні афінності зв'язування з антигеном CD134 (половинне максимальне заміщення або інгібування (IC_{50}) біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини в концентрації $\approx 3,5$ мкг/мл). Усі шість

5 немічених гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини – 12H3_VL1H1, 12H3_VL1H2, 12H3_VL1H3, 12H3_VL2H1, 12H3_VL2VH2 і 12H3_VL2VH3 – демонстрували ідентичне заміщення біотинильованого батьківського клону 12H3 моноклонального антитіла миші проти CD134 людини, яке свідчить, що всі шість немічених гуманізованих версій клону 12H3 антитіла IgG4к проти CD134 людини демонструють ідентичні афінності зв'язування з

10 антигеном CD134 ($IC_{50} \approx 1,5$ мкг/мл).

Дані результати демонструють, що всі шість версій клону 12H3 гуманізованого антитіла IgG4к проти CD134 людини продемонстрували більшу афінність зв'язування з антигеном CD134, ніж батьківський клон 12H3 антитіла миші проти CD134 людини і клон 12H3 химерного антитіла IgG4к людини проти CD134 людини.

15 Приклад 12. Антитіла проти CD134 пригнічують експресію FOXP3 у клітинах Treg

Виділення і експансія Treg: Leucoracks одержували від Biological Specialties (Colamar, PA), і червоні кров'яні клітини лізували буфером ACK (Stemcell technologies, Vancouver, BC, Canada) на льоді. Клітини промивали і ресуспендували в електродному буфері AutoMACS. Treg виділяли за допомогою набору CD4+CD25+CD127dim/- Treg на сортері AutoMACS Pro i/або LD колонках з

20 QuadroMACS, усі з яких були отримані від Miltenyi Biotec (San Diego, CA) згідно з інструкцією виробника. Treg підраховували і висіювали на 24-ямкові планшети в концентрації 1×10^6 Treg/лунку в середовищі TechMACS з бусинами для експансії Treg (частки MACSiBead, з попередньо нанесеними антитілами проти CD3 і CD28; Miltenyi Biotec) згідно з інструкцією виробника. Клітини культивували у співвідношенні 4 бусини/клітину в присутності ~ 500 МЕ/мл ІЛ-2 і Рапаміцину (100 нм). Через 5 днів після виділення клітини переносили на 6-ямковий

25 планшет і додавали по 40 мкл бусин/лунку, середовище з ІЛ-2 (500 МЕ/мл) і Рапаміцин (100 нм). Середовище, що містить ІЛ-2, додавали в необхідній кількості і клітини переносили на 10 мм круглодонні планшети і вирощували далі. Через 30 днів бусини видаляли за допомогою MACSiMAG перед наступним застосуванням.

30 Активація Treg: Експандовані Treg мітили барвником Celltrace Violet згідно з інструкцією виробника (Life Technologies, Grand Island, NY). $1,5 \times 10^5$ експандованих Treg і 3×10^5 бусин для експансії Treg (частки MACSiBead з попередньо нанесеними антитілами проти CD3 і CD28; Miltenyi Biotec) висіювали на 96-лункових планшетах зі скругленим дном і інкубували при температурі 37°C у середовищі X-VIVO 15 з додаванням 5 % сироватки, 1 % Pen-Strep і ~ 500 МЕ/мл ІЛ-2 з додаванням або без додавання 12H3 (0,5 і 5 мкг/мл) i/або OX40L людини (1 мкг/мол, R&D Systems) і MAT проти His (1 мкг/мл, R&D Systems). Через 3 дні клітини повторно стимулювали коктейлем для активації лейкоцитів з BD GolgiPlug (2 мкл/мол, BD Biosciences, San Jose, CA) протягом 5 годин, промивали і забарвлювали за допомогою набору LIVE/DEAD®

35 Fixable Near-ir Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) згідно з інструкцією виробника. Клітини промивали один раз, і після фіксації/пермеабілізації проводили внутрішньоклітинне забарвлення за допомогою набору Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA) згідно із протоколом виробника. Застосовували наступні антитіла: CD3 V500 (клон SP34-2, BD Biosciences); FOXP3 PE (клон 206D, Biolegend); CD4 PerCP (клон OKT4, Biolegend); і OX40 (клон АСТ35, eBioscience). Клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4°C і промивали. Клітини аналізували в проточному цитометрі BD Canto (BD Biosciences) і аналізували із застосуванням програмного забезпечення FlowJo (Ashland, OR), налаштованого на відбір живих одиночних CD3+CD4+. Записували середню геометричну інтенсивність флуоресценції, отриману для ФЕ проти FOXP3 (R-Фікоеритрин) (geoC1F).

40

Результати, представлені на фігурі 40, свідчать, що як антитіло 12H3 миші проти CD134 людини (IgG1), так і OX40L людини зменшували експресію FOXP3 в експандованих Treg (CD4+CD25-CD127 dim/-). Коли 12H3 і OX40L використовували в комбінації, дія супресії експресії FOXP3 була аддитивною. Результати свідчать, що антитіло 12H3 миші проти імуноглобулінів людини прямо впливає на функцію Treg, а не тільки за допомогою його ролі на ефекторні Т-клітини. Дані являють собою результат аналізу зразка від одного донора в трьох

45

55 повторах.

Приклад 13. Приєднані до планшета гуманізовані антитіла проти CD134 збільшують супресію Treg клітин Teff

Оцінювали ефект гуманізованих антитіл проти CD134 12H3 VL1VH1 або 12H3 VL1VH2 (обоє IgG4/к) на супресію Treg функції Teff.

Трег виділяли, експандували і активували, як описано в прикладі 12. Де зазначено, на 96-ямові планшети із круглим дном наносили по 12Н3 VL1VH1 або 12Н3 VL1VH2 антитіла або контрольних ізотипів (10 мкг/мл), розведених у ФБР. Планшети інкубували протягом 2 годин при температурі 37 °С, потім промивали і використовували для аналізу супресії. CD4+ ефекторні Т-клітини (Teff), виділені від того самого донора, що і Treg, очищували від заморожених МКПК із застосуванням сортеру AutoMACS Pro і набору для виділення CD4+ від Miltenyi Biotech відповідно до інструкцій виробника. Потім клітини Teff мітили барвником Celltrace™ Violet згідно з інструкцією виробника (Life Technologies, Grand Island, NY). Клітини Teff ресуспендували в середовищі X-VIVO 15 з додаванням 5 % сироватки, 1 % Pen-Strep. У кожну лунку додавали 1 × 10⁵ клітин. Treg додавали у співвідношенні Treg:Teff 0:1 (Teff самі по собі), 1:2, 1:4 і 1:8. Бусини Treg Suppression Inspector (Miltenyi Biotech) промивали і додавали до лунок у співвідношенні 1 бусина на клітину (Teff або Treg). Кінцевий об'єм у кожній лунці доводили до 200 мкл. Планшети інкубували при температурі 37 °С протягом 4 днів. Клітини повторно стимулювали коктейлем для активації лейкоцитів з BD GolgiPlug (2 мкл/мл, BD Biosciences, San Jose, CA) протягом 5 годин, промивали і забарвлювали за допомогою набору LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) згідно з інструкцією виробника. Клітини промивали і проводили забарвлення поверхні за допомогою об'єднаних з АФЦ (аллофікоціаніном) антитіл проти ОХ40 (клон АСТ35, eBioscience) з наступним внутрішньоклітинним забарвленням. Фіксацію/пермеабілізацію проводили за допомогою набору Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA) згідно із протоколом виробника. Використовували наступні антитіла: CD3 V500 (клон SP34-2, BD Biosciences); CD4 ФІТЦ (клон RPA-T4, Biolegend). Клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4 °С і промивали. Клітини аналізували на проточному цитометрі BD Canto (BD Biosciences) і аналізували із застосуванням програмного забезпечення FlowJo (Ashland, OR), настроєного на відбір живих одиночних CD3+CD4+Celltrace+.

Приєднані до планшета гуманізовані антитіла 12Н3 послабляли інгібування Treg проліферації Teff. На фігурі 41 представлена колонкова діаграма аналізів FACS з порівнянням проліферації клітин Teff, стимульованих бусинами Treg Suppression Inspector (Miltenyi, San Diego, CA) і оброблених приєднаними до планшета 12Н3 VL1VH1 або контрольним ізотипом IgG4 у присутності Treg у співвідношенні Treg/Teff 1:2. У порівнянні з контрольним ізотипом (пIgG4) 12Н3 VL1VH1 послабляв інгібуючу дію Treg на проліферацію Teff, про що свідчить збільшення кількості клітин у послідовних піках (менша інтенсивність флуоресценції), що представляють почергові розділення клітин, виявлені за допомогою барвника Celltrace™ Violet. Барвник Celltrace™ Violet зв'язується з активованими аміногрупами усередині клітин.

На фігурі 42 представлений ефект химерного антитіла 12Н3 (IgG4/к людини), гуманізованих антитіл 12Н3 VL1VH1 або 12Н3 VL1VH2 (обоє IgG4/к) самих по собі або в комбінації з ОХ40L (5 мкг/мл)/MAT проти His (5 мкг/мл) на реплікацію Teff клітин при співвідношенні Treg:Teff 0:1 (фігура 42А) або 1:4 (фігура 42В) на клітинах, виділених від одного донора. При відсутності Treg (фігура 42А) стимулюючі бусини CD2/CD3/CD28 самі по собі стимулювали проліферацію Teff, експресуючих CD134 людини (тобто контроль ізотипу). Химерне і гуманізоване антитіла проти CD134, а також ОХ40L стимулювали проліферацію CD4+Т-клітин у порівнянні з контрольним ізотипом. Проліферація незначно збільшувалася у випадку комбінації 2Н3 VL1VH2 (SF2) з ОХ40L. У присутності Treg (фігура 42В) стимулюючі бусини CD2/CD3/CD28 самі по собі стимулювали меншу проліферацію CD4 Т-клітин у порівнянні із проліферацією CD4 Т-клітин без супресії Treg (індекс реплікації приблизно 3 у порівнянні із приблизно 5). Супресія Treg послаблялася в присутності химерного антитіла 12Н3, гуманізованих антитіл 12Н3 VL1VH1 і 12Н3 VL1VH2, а також ОХ40L. Комбінація 12Н3 VL1VH1 або 12Н3 VL1VH2 з ОХ40L демонструвала незначну синергетичну дію. На фігурі Teff проліферацію клітин виражали у вигляді індексу реплікації, який являє собою вимірювання ступеня експансії Teff клітин, що поділилися щонайменше один раз, у відповідь на стимул (наприклад, кількість клітин у мільйонах по закінченню культивування, які перетерпіли щонайменше один розподіл).

У таблиці 3 наведені узагальнюючі результати ефекту 12Н3 VH1VH2 (IgG4/к) на дію проліферації Teff у присутності Treg у співвідношенні Treg/Teff 0:1, 1:2 і 1:4 для 12Н3 VL1VH2 (IgG4к) у клітинах, отриманих від 5 донорів. Ступінь проліферації виражали у вигляді індексу реплікації. При відсутності Treg 12Н3 VL1VH2 стимулювало проліферацію клітин Teff для всіх клітин, отриманих від донорів, у порівнянні з контрольним ізотипом (Teff, активовані із застосуванням бусин CD2/CD3/CD28). У присутності Treg у співвідношенні Treg/Teff 1:2 або 1:4 присутність 12Н3 VL1VH2 послабляло супресію Treg для всіх клітин, отриманих від донора.

Результати свідчать, що 12H3 VL1VH1 і 12H3 VL1VH2 виявляють ефект на CD4-ефекторні Т-клітини, що стимулює їхню проліферацію, і що антитіла наділяють Teff деяким ступенем стійкості до Treg або що Treg самі по собі є менше супресивними в присутності антитіл.

Таблиця 3

Співвідношення Treg/Teff	0:1		1:2		1:4	
	Контрольний ізотип	12H3 VL1VH2	Контрольний ізотип	12H3 VL1VH2	Контрольний ізотип	12H3 VL1VH2
1	10,40	13,90	3,02	5,33	3,77	5,23
2	10,50	12,10	4,60	5,82	5,01	5,21
3	5,23	10,24	4,76	6,00	4,54	5,23
4	5,60	10,67	4,56	6,05	5,02	5,51
5	4,81	8,66	3,61	4,71	3,69	4,81

5

Приклад 14. Оптимізація гуманізованих антитіл

Оптимізація гуманізованих антитіл 20E5.

10 HCDR2 варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюга (VH) 20E5_VH1, 20E5_VH2 і 20E5_VH3 містить мотив ізомеризації в положеннях залишків VH 56-57 (DG, D₅₆G₅₇). Для дослідження ефекту замін у положеннях 56 залишок аспартату (D) замінювали гліцином (G), аланіном (A), серином (S) або глутаматом (E).

15 HCDR3 варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюга 20E5_VH1, 20E5_VH2 і 20E5_VH3 містить метіонін (M) у положенні 106 (M106). Метіонін, імовірно, у значній мірі екранований, однак для зменшення ризику окиснення метіонін у положенні 106 замінювали лейцином (L) або ізолейцином (I).

20 Положення 11 у варіабельних областях гуманізованого важкого ланцюга 20E5_VH1, 20E5_VH2 і 20E5_VH3 містить валін (V). Заміни в даному положенні можуть впливати на антитіло і внаслідок цього на його функцію (Klein et al mAbs 5:22-33, 2013). Для дослідження ефекту замін у положеннях 11 залишок валіну (V) замінювали лейцином (L).

25 Мутації вводили в кожен варіабельну область важкого ланцюга 20E5_VH1, 20E5_VH2 і 20E5_VH3 із застосуванням стандартних способів. Мутантні послідовності HCDR2 представлені в таблиці 4 і мутантні послідовності HCDR3 представлені в таблиці 5. Оптимізовані гуманізовані варіабельні області 20E5, що містять одиничні заміни представлені в таблиці 6. Вирівнювання батьківських і оптимізованих областей VH презентовано на фігурі 43A і фігурі 43B. Назви оптимізованих областей VH вказують на батьківську VH і проведену заміну. Додаткові оптимізовані варіабельні області можуть бути отримані шляхом введення замін одночасно в положеннях 11, 56 і/або 106 із застосуванням стандартних способів.

30 Утворювали пари отриманих у результаті областей VH з варіабельними областями легкого ланцюга 20E5_VL1 або 20E5_VL2, і отримані в результаті антитіла експерсували у вигляді IgG4/k із застосуванням стандартних способів. Досліджували зв'язування антитіл з CD134 із застосуванням ELISA відповідно до протоколу, описаного в прикладі 11A. Потім досліджували здатність антитіл викликати проліферацію клітин Teff і пригнічувати інгібуючу дію Treg на проліферацію Teff із застосуванням протоколів, описаних у прикладі 13. Антитіла, що мають порівняні властивості з батьківським гуманізованим антитілом 20E5, вибирали для подальших досліджень.

35

Таблиця 4

SEQ ID NO:	Послідовність HCDR2	Заміна
135	YINPYNGGTTYNEKFKG	D56G
136	YINPYNAGTTYNEKFKG	D56A
137	YINPYNSGTTYNEKFKG	D56S
138	YINPYNEGTTYNEKFKG	D56E

Таблиця 5

SEQ ID NO:	Послідовність HCDR3	Заміна
139	YYGSSLSLDY	M106L
140	YYGSSLSIDY	M106I

Таблиця 6

SEQ ID NO:	Назва оптимізованої VH
101	20E5_VH1_D56G
102	20E5_VH2_D56G
103	20E5_VH3_D56G
104	20E5_VH1D56A
105	20E5_VH2_D56A
106	20E5_VH3_D56A
107	20E5_VH1D56S
108	20E5_VH2_D56S
109	20E5_VH3_D56S
110	20E5_VH1D56E
111	20E5_VH2_D56E
112	20E5_VH3_D56E
113	20E5_VH1M106L
114	20E5_VH2_M106L
115	20E5_VH3_M106L
116	20E5_VH1M106I
117	20E5_VH2_M106I
118	20E5_VH3_M106I
149	20E5_VH1_V11L
150	20E5_VH2_V11L
151	20E5_VH3_V11L

Оптимізація гуманізованих антитіл 12H3.

5 HCDR2 варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюга (VH) 12H3_VH1, 12H3_VH2 і 12H3_VH3 містить мотив деамидування (NNG) у залишках 54-56 (N₅₄N₅₅G₅₆). Для мінімізації ризику деамидування аспарагін у положеннях 55 (N55) замінювали глютаміном (Q), аланіном (A) або глутаматом (E).

10 HCDR3 варіабельних областей гуманізованого важкого ланцюга 12H3_VH1, 12H3_VH2 і 12H3_VH3 містить метіонін (M) у положеннях 99 (M99). Метіонін, імовірно, у значній мірі екранований, однак для зменшення ризику окиснення метіонін у положеннях 99 замінювали лейцином (L) або ізолейцином (I).

15 Положення 11 у варіабельних областях гуманізованих важких ланцюгів 12H3_VH1, 12H3_VH2 і 12H3_VH3 містить валін (V). Заміни в даному положенні можуть впливати на антитіло і внаслідок цього на його функцію (Klein et al mAbs 5:22-33, 2013). Для дослідження ефекту замін у положенні 11 залишок валіну (V) замінювали лейцином (L).

20 Мутації вводили в кожен варіабельну область важкого ланцюга 12H3_VH1, 12H3_VH2 і 12H3_VH3 із застосуванням стандартних способів. Мутантні послідовності HCDR2 представлені в таблиці 7 і мутантні послідовності HCDR3 представлені в таблиці 8. Оптимізовані гуманізовані варіабельні області 12H3, що містять одиничні заміни представлені в таблиці 9. Вирівнювання батьківських і оптимізованих областей VH презентовано на фігурі 44. Назви оптимізованих областей VH вказують на батьківську VH і проведену заміну. Додаткові оптимізовані варіабельні області можуть бути отримані шляхом введення замін одночасно в положення 11, 55 і/або 99 із застосуванням стандартних способів.

25 Утворювали пари отриманих в результаті областей VH з варіабельними областями легкого ланцюга 12H3_VL1 або 12H3_VL2, і отримані в результаті антитіла експерсували у вигляді IgG4/k із застосуванням стандартних способів. Досліджували зв'язування антитіла з CD134 із застосуванням ELISA відповідно до протоколу, описаного в прикладі 11A. Потім досліджували здатність антитіла викликати проліферацію клітин Teff і пригнічувати інгібуючу дію Treg на проліферацію Teff із застосуванням протоколів, описаних у прикладі 13. Антитіла, що мають

порівняні властивості з батьківським гуманізованим антитілом 12H3, вибирали для подальших досліджень.

Таблиця 7

SEQ ID NO:	Послідовність HCDR2	Заміна
141	GIYPNQGGSTYNQNFKD	N55Q
142	GIYPNAGGSTYNQNFKD	N55A
143	GIYPNEGGSTYNQNFKD	N55E

Таблиця 8

SEQ ID NO:	Послідовність HCDR3	Заміна
144	LGYNHGPLDFDV	M99L
145	IGYNHGPLDFDV	M99I

5

Таблиця 9

SEQ ID NO:	Назва оптимізованої VH
119	12H3_VH1_N55Q
120	12H3_VH2_N55Q
121	12H3_VH3_N55Q
122	12H3_VH1_N55A
123	12H3_VH2_N55A
124	12H3_VH3_N55A
125	12H3_VH1_N55E
126	12H3_VH2_N55E
127	12H3_VH3_N55E
128	12H3_VH1_M99L
129	12H3_VH2_M99L
130	12H3_VH3_M99L
131	12H3_VH1_M99I
132	12H3_VH2_M99I
133	12H3_VH3_M99I
146	12H3_VH1_V11L
147	12H3_VH2_V11L
148	12H3_VH3_V11L

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BiocerOX Products B.V.
 <120> АНТИТІЛА ПРОТИ CD134 (OX40) І ЗАСТОСУВАННЯ ЗАЗНАЧЕНИХ АНТИТІЛ
 <130> P101024PC00
 <150> ep 13159794.0
 <151> 2013-03-18
 <150> EP 13159794.0
 <151> 2013-03-18
 <160> 152
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(28)
 <220>
 <221> TRANSMEM
 <222> (215)..(235)
 <400> 1
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 2
 <211> 834

<212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Послідовність кДНК CD134 людини, оптимізована для клітин комах Sf9

<400> 2
 atgtgcgtgg gcgctcgtcg tctgggtcgt ggtccctgcg ctgctctgct gctgctgggt 60
 ctgggcctgt ccaactgtcac tggactccac tgcgtgggcg acacctacc ctccaacgac 120
 cgttgctgcc acgaatgcag gcctggcaac ggcatgggtgt cccgttgctc ccgttcccag 180
 aacaccgtgt gccgtccctg cgggcccggt ttctacaacg acgtgggtgc ctccaagccc 240
 tgcaagcctt gcaacttggtg taacctccgc tccggttccg agcgcсаagca gctgtgcacc 300
 gctaccцagg аcactgtctg taggtgcagg gctggcacc agcccctgga ctctacaag 360
 cccgggtgctg actgcgctcc ctgccccctt ggtcacttct ctcccggcga caaccagget 420
 tgcaaacat ggaccaactg caccctggct ggcaagcaca ccctgcagcc cgcttccaac 480
 tcctccgacg ctatctgcga ggaccgtgac cccccgtcta ctcaacctca ggagactcag 540
 ggtccccccg ctgctcccat caccgtgcag cccaccgagg ctggccccg tacctcccaa 600
 ggacctagca ctaggcctgt ggagggtccc ggtggtcgtg ctgtggctgc tatcctgggc 660
 ctgggtctgg tgctgggect gctgggtccc ctggctatcc tgctggctct gtacctctg 720
 cgtcgtgacc agcgtctgcc ccccgacgt cacaaagcccc ctggtgggtg ttccttccgt 780
 acccccatcc aggaggagca ggctgacgct cactccacc tggccaagat ctaa 834

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

<220>
 <223> N-термінальна амінокислотна послідовність важкого ланцюга клону 20E5

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 1 5 10

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

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга клону 20E5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга клону 20E5

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга клону 20E5

<400> 6

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

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга клону 20E5

<400> 7

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

Gly

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

<220>
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга клону 20E5
<400> 8

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

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

<220>
<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга клону 20E5
<400> 9

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

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна

<220>
<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга клону 20E5
<400> 10

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

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

<220>
<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга клону 20E5
<400> 11

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
 1 5

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

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга клону
 12H3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
 115 120

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

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга клону

12H3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR1 важкого ланцюга клону 12H3

<400> 14

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

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR2 важкого ланцюга клону 12H3

<400> 15

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

Asp

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR3 важкого ланцюга клону 12H3

<400> 16

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

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR1 легкого ланцюга клону 12H3

<400> 17

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

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR2 легкого ланцюга клону 12H3

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CDR3 легкого ланцюга клону 12H3

<400> 19

Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 20

<211> 1398

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Оптимізована для СНО послідовність, яка кодує ланцюг IgG4 химерного клону 20E5 людини

<400> 20

```

atggagtgga gcggagtgtt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcactcagag      60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc      120
tgtaaagcta gcggctacac cttcactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc      180
ggccagggcc tggagtggat cggctatatt aaccctata acgacggcac taagtataac      240
gagaagtfta agggcaaggc taccctgact agcgataagt ctagctctac cgcctatatg      300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgcgctaa ctactacggc      360
tctagcctgt ctatggacta ctggggccag ggcactagcg tgaccgtgtc tagcgcctagc      420
actaagggcc ctagcgtggt cccctggcc cctgctcta gatctactag cgagtctacc      480
gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat      540
agcggcgctc tgactagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc tagcggcctg      600
tatagtctgt ctagcgtggt caccgtgcct agttctagcc tgggcactaa gacctacacc      660
tgtaacgtgg accacaagcc ctctaact aagggtggaca agcgggtgga atctaagtac      720
ggcctecct gccccctg cctgccct gaatttctgg gcggacctag tgtgttcctg      780
ttccacctc agcctaagga caccctgatg atctctagaa cccccgaagt gacctgcgtg      840
gtggtggacg tgtcacagga agatcccag gtccagtfta attggtacgt ggacggcgtg      900
gaagtgcaca acgctaagac taagcctaga gaggaacagt ttaactctac ctatagggtc      960
    
```

gtcagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta taagtgtaaa 1020
 gtgtctaaca agggcctgcc tagctctatc gaaaagacta tctctaaggc taagggccag 1080
 cctagagaac ctcaggtcta caccctgccc cctagtcagg aagagatgac taagaatcag 1140
 gtgtcactga cctgtctggt caagggttc taccttagcg atatcgccgt cgagtgggag 1200
 tctaacggcc agcccagaaa caactataag actaccccc ctgtgctgga tagcgacggt 1260
 agcttcttcc tgtactcacg gctgaccgtg gataagtcta ggtggcagga aggcaacgtc 1320
 tttagctgta gcgtgatgca cgaggccctg cacaatcact acactcagaa gtcactgagc 1380
 ctgagcctgg gcaagtga 1398

<210> 21
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Оптимізована для СНО послідовність, яка кодує ланцюг каппа химерного клону 20E5 людини

<400> 21
 atggagtgga gcggagtgtt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagat 60
 attcagatga ctcagactac ctctagcctg agcgctagcc tgggcatag agtgactatt 120
 agctgtagag ctagtcagga tatctctaac tacctgaact ggtatcagca gaaacccgac 180
 ggcaccgtga agctgctgat ctactacacc tctagactgc actcaggcgt gccctctagg 240
 tttagcggta gcggtagtgg caccgactat agcctgacta tctctaacct ggaacaggaa 300
 gatatcgcta cctacttctg tcagcagggc aacaccctgc cctggacctt cggcggaggc 360
 actaagctgg aatcaagcg gaccgtggcc gtcacctcag tgtttatctt cccacctagc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgctagc gtcgtgtgcc tgctgaacaa ctctaccct 480
 agagaagcta aggtgcagtg gaaagtggat aacgccctgc agtcaggcaa ctctcaggaa 540
 tcagtcaccg agcaggactc taaggatagc acctatagcc tgtctagcac cctgaccctg 600
 tctaaggccg actacgagaa gcacaaggtc tacgcttcg aagtgactca ccagggactg 660
 tctagccccg tgactaagtc cttaataga ggcgagtgtc ga 702

<210> 22
 <211> 1407

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Оптимізована для СНО послідовність, яка кодує ланцюг IgG1 химерного клону 20E5 людини

<400> 22

```

atggagtggg caggcgtggt catgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcactcagag      60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc      120
tgtaaagcta gcggctacac cttcactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc      180
ggtcagggcc tggagtggat cggctatatt aaccctata acgacggcac taagtataac      240
gagaagttta agggtaaagc taccctgact agcgataagt ctagctctac cgctatatg      300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgcgctaa ctactacggc      360
tctagcctgt ctatggacta ctggggctag ggcaactagc tgaccgtgtc tagcgctagc      420
actaagggcc ctagcgtggt cccctggcc cctagctcta agtctactag cggcggcacc      480
gccgctctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgagc ccgtgacct cagctggaat      540
agcggcgcctc tgactagcgg agtgcacacc ttccccgccc tgctgcagtc tagcggcctg      600
tatagtctgt ctagcgtggg caccgtgcct agttctagcc tgggcaactca gacctatc      660
tgtaacgtga accacaagcc ctctaact aagggtggaca agaaggtgga acctaaagtc      720
tgcgataaga ctcacacctg tccccctgc cctgcccctg agctgctggg aggacctagt      780
gtgttcctgt tcccacctaa gcctaaggac accctgatga tctctagaac cccgaagtg      840
acctgcgtgg tgggtggact cagtcacgag gaccctgaag tgaagttaa ttggtacgtg      900
gacggcgtgg aagtgacaaa cgctaagact aagcctagag aggaacagta taactctacc      960
tatagggctg tcagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg taaagagtat     1020
aagtgtaaag tgtctaaca ggccctgcca gccctatcg aaaagactat ctctaaggct     1080
aagggtcagc ctagggaacc tcaggcttac accctgcccc ctagtaggga cgagctgact     1140
aagaatcagg tcagcctgac ttgtctggtc aagggttct accctagcga tatcgccgtc     1200
gagtgggagt ctaacgggtc gcccgagaac aactataaga ctaccccccc tgtgctggat     1260
agcgacggta gcttcttct gtactctaaa ctgaccgtgg ataagtctag gtggcagcag     1320
ggtaacgtgt tcagctgtag cgtgatgcac gaggccctgc acaatcacta cactcagaag     1380

```


tcactgagcc tgagccccgg taagtga 1407

<210> 23

<211> 1404

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Оптимізована для СНО послідовність, яка кодує ланцюг IgG4 химерного клону 12Н3 людини

<400> 23

atggagtggt ctgggtctct tatgttccctg ctgtccgtga ccgctgggtgt ccacagcgag 60
 gtgcagctgc agcagtcctgg ccctgagctg gtgaaacctg gcgectccgt gaagatctcc 120
 tgcaagacct ccggctacac cttcaaggac tacacaatgc actgggtgaa acagtccac 180
 ggcaagtccct tggagtggat cggcgggaatc taccacaaca acggcggctc cacctacaac 240
 cagaacttca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctctctcac cgctatatg 300
 gaatttcggt ccctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgcccg gatgggctac 360
 cacggccccc acctggattt cgacgtgtgg ggcgctggca ccacctgac cgtgtctcca 420
 gctagcacca agggccccctc cgtgttccct ctggccccct gctcccggtc cacctccgag 480
 tctaccgccc ctctgggctg cctgggtgaaa gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtcc 540
 tggaaactctg gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 600
 ggccctgtact ccctgtcctc cgtgggtgaca gtgccctcct ccagcctggg caccaagacc 660
 tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 720
 aagtacggcc ctccctgccc accttgccct gccctgaat ttctgggctg accttccgtg 780
 ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 840
 tgcgtgggtgg tggacgtgtc ccaagaagat cccgaggtcc agttcaattg gtacgtggac 900
 ggctgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa ctccacctac 960
 cgggtgggtgt ccgtgctgac cgtgctgac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
 tgcaaggctct ccaacaaggg cctgcccagc tctatcgaaa agacaatctc caaggccaag 1080
 ggccagcccc gcgagccccg ggtgtacacc ctgcctcca gcccaagaaga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt ccctgacttg tctgggtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgcctcag 1200
 tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctgta ctctcggctg acagtggata agtcccgggtg gcaagaaggc 1320
 aacgtcttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
 ctgtccctga gcctgggcaa gtag 1404

<210> 24
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Оптимізована для СНО послідовність, яка кодує ланцюг каппа химерного клону 12Н3 людини

<400> 24
 atggagtggg cgggtgtctt tatgttcctg ctgtccgtga ccgctggcgt gcactccgat 60
 atcgtgatga cccagtcccc caagtattatg tccacctccc tgggcgacag agtctctatt 120
 acctgcaagg cctcccagga cgtgggcgct gccgtggcct ggatcagca gaagcccggc 180
 cagtccccca agctgctgat ctactgggcc tccaccagac acaccggcgt gcccgacaga 240
 ttcaccggcg gaggtcttgg caccgacttc accctgacaa tctccaacgt gcagtccgag 300
 gacctgaccg actacttctg ccagcagtat atcaactacc ccctgacctt cggcggaggc 360
 accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gtcctctccg tgtttatctt cccacctcc 420
 gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtctgcc tgctgaacaa cttctacccc 480
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctccccagaa 540
 tccgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtctctccac cctgacctg 600
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660
 tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgtct aa 702

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

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність ланцюга IgG4 химерного клону 20E5 людини

<400> 25

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450 455 460

Lys
 465

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

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність ланцюга каппа химерного клону 20E5 людини

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 27

<211> 468

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність ланцюга IgG1 химерного 20E5 людини

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 28

<211> 467

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність ланцюга IgG4 химерного 12H3 людини

<400> 28

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

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

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

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

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

Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp
115 120 125

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

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

	195						200							205	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
	210						215							220	
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
	225					230				235					240
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
					245					250					255
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260						265					270	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
		275						280					285		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290						295					300			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
	305					310						315			320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					325					330					335
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
					340				345						350
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		355						360						365	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		370					375					380			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	385					390					395				400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					405					410					415

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

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

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

Leu Gly Lys
 465

<210> 29

<211> 233

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність ланцюга каппа химерного клону 12Н3 людини

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 30

<211> 240

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CD134_CRD2 людини (ак 1-28 >> 66-277)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (178)..(198)

<400> 30

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

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

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

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

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність CD134_CRD3 людини (ак 1-28 >< 108-277)

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

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

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Ala Lys Ile
 195

<210> 32

<211> 179

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність CD134_CRD4 людини (ак 1-28 >< 127-277)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (117)..(137)

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ile

<210> 33

<211> 159

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Амінокислотна послідовність усіченого CD134_CRD4 людини (ак 1-28 >< 147-277)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(28)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (97)..(117)

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

Asp Cys Ala

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

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 36

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

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

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

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

Gly Gly Arg Ala
 65

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

<400> 37

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

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

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

<400> 38

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

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

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
 35

<210> 39
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> антизмістовий праймер мкаппа (праймер №: 201)

<400> 39
 gacagttggg gcagcatcag

20

<210> 40
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> антизмістовий праймер мкаппа (праймер №: 266)

 <400> 40
 cactggatgg tgggaagatg 20

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> антизмістовий праймер mlgG1 (праймер № 203)

 <400> 41
 ggccagtgga tagacagatg 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> антизмістовий праймер mlgG1 (праймер № 204)

 <400> 42
 tggacagggg tccagattc 20

 <210> 43
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> змістовий праймер 20E5HC (праймер № 259)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> п являє собою а, с, г або т

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 43

gcgaagtaca aytncarcac wsngg

25

<210> 44

<211> 25

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> змістовий праймер 20E5HC (праймер № 260)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> п являє собою а, с, г або т

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 44

gcgtacaatt acarcacarsn ggnc

25

<210> 45

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> змістовий праймер 20E5LC (праймер № 265)

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> п являє собою а, с, г або т

<400> 45

gcgatataca ratgacncac ac

22

<210> 46

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> антизмістовий праймер mlgG1 (праймер № 416)

<400> 46		
cagtggatag acagatgggg g		21
<210> 47		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна		
<220>		
<223> антизмістовий праймер мкаппа (праймер №: 394)		
<400> 47		
actggatggt gggaagatgg		20
<210> 48		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Штучна		
<220>		
<223> змістовий праймер сигнального пептиду (праймер № 405)		
<400> 48		
atgggatgga gctrtatcat sytctt		26
<210> 49		
<211> 26		
<212> ДНК		
<213> Штучна		
<220>		
<223> змістовий праймер сигнального пептиду (праймер № 410)		
<400> 49		
atggnatgga gckgggtctt tmtctt		26
<210> 50		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна		
<220>		
<223> змістовий праймер сигнального пептиду (праймер № 389)		
<400> 50		
atgggcwtca aagatggagt caca		24
<210> 51		

<211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> змістовий праймер лідерної послідовності CD134 (праймер № 362)

 <400> 51
 ctcggatccg ccaccatgtg cgtg 24

 <210> 52
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> змістовий праймер RD2 (праймер № 364)

 <400> 52
 actgtcactg gaccctgcgg tccc 24

 <210> 53
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> антизмістовий праймер CRD2 (праймер № 365)

 <400> 53
 gggaccgсag ggtccagtga cagt 24

 <210> 54
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> змістовий праймер CRD3 (праймер № 366)

 <400> 54
 actgtcactg gaaggtgcag ggct 24

 <210> 55
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

 <220>
 <223> праймер кінцевої послідовності CD134 (праймер № 363)

<400> 55
 agaattctta ttagatcttg gccca 24

<210> 56
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> антизмістовий праймер CRD3 (праймер № 367)

<400> 56
 agccctgcac cttccagtga cagt 24

<210> 57
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> змістовий праймер CRD4 (праймер № 368)

<400> 57
 actgtcactg gaccctgccc ccct 24

<210> 58
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> антизмістовий праймер CRD4 (праймер № 369)

<400> 58
 aggggggсag ggtccagtga cagt 24

<210> 59
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> змістовий праймер усіченого CRD4 (праймер № 370)

<400> 59
 actgtcactg gatgcaccct ggct 24

<210> 60

<211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> антизмістовий праймер усіченого CRD4 (праймер № 371)

<400> 60
 agccagggtg catccagtga cagt 24

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

<220>
 <223> N-термінальна амінокислотна послідовність легкого ланцюга клону 20E5

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

<210> 62
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL1 клону 20E5

<400> 62
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL2 клону 20E5

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

<210> 64
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області важкого ланцюга VH1 клону 20E5

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області важкого ланцюга VH2 клону 20E5

<400> 65

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

	20						25						30		
Val	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
					115										

<210> 66

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області важкого ланцюга VH3 клону 20E5

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL1 клону 12H3

<400> 67

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr 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 Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 68
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL2 клону 12H3

<400> 68

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
 20 25 30

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

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

Gly 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 Ile Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 69
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області важкого ланцюга VH1 клону 12H3

<400> 69

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDI варіабельної області важкого ланцюга VH2 клону 12H3

<400> 70

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDI варіабельної області важкого ланцюга VH3 клону 12H3

<400> 71

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

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

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

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

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

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

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

100

105

110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 72
- <211> 1398
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 20E5, який містить гуманізовану способом PDL VH1

<400> 72
 atggaatgga gcgcgctggt catgttcttg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagtcag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg gcgcctccgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccggctacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggcccct 180
 ggccagagac tggaatggat gggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac 240
 gagaagtcca agggcagagt gaccatcacc tccgacacct ccgcctccac cgcctacatg 300
 gaactgtcct ccttgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccaa ctactacggc 360
 tcctccctgt ctatggacta ctggggccag ggcacctcg tgaccgtgtc ctctgctagc 420
 accaagggcc cctccgtggt tcctctggcc ccttctcca gatccacctc cgagtctacc 480
 gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 540
 tctggcgccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccagctg tgetgcagtc ctccggcctg 600
 tactccctgt cctccgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcaccaa gacctacacc 660
 tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aagggtggaca agcgggtgga atctaagtac 720
 ggccctcctt gccaccctg ccctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttcctg 780
 tttccccaa agcccaagga caccctgatg atctcccgga cccccgaagt gacctgcgtg 840
 gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 900
 gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 960
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 1020
 gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1080

ccccgggaac cccaggtgta cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1140
 gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1200
 tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttc tgtactctcg cctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg 1320
 ttctcctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaccact acaccagaa gtcctgtcc 1380
 ctgtctctgg gcaagtag 1398

<210> 73
 <211> 1398
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 20E5, який містить гуманізовану способом PDL VH2

<400> 73
 atggaatgga gcggcgtgtt catgttccig ctgtccgtga ccgcgaggagt gcattctcag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg gcgcctccgt gaagggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccggctacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggccccct 180
 ggccagagac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac 240
 gagaagttca agggcagagc caccatcacc tccgacacct ctgcctccac cgctacatg 300
 gaactgtcct ccttgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgcaa ctactacggc 360
 tcctccctgt ctatggacta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctctgctagc 420
 accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc ctttgcacca gatccaccte cgagtctacc 480
 gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 540
 tctggcgccc tgacctcgg cgtgcacaca tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 600
 tactccctgt cctccgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcaccaa gacctacacc 660
 tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 720
 ggccctcctt gcccaacctg ccctgcccct gaatttctgg gcggaccttc cgtgttccctg 780
 tttccccaa agcccaagga caccctgatg atctccgga cccccgaagt gacctgcgtg 840
 gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 900

gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 960
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 1020
 gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1080
 ccccgggaac cccaggtgta cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1140
 gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1200
 tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttctcc tgtactctcg cctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg 1320
 ttctctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgtcc 1380
 ctgtctctgg gcaagtag 1398

<210> 74
 <211> 1398
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 20E5, який містить гуманізовану способом PDL VH3

<400> 74
 atggaatgga gcgcggtggt catgttcctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcattctcag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacctg ggcctccgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccggctacac ctttaccagc tacgtgatgc actgggtgcg acaggccct 180
 ggccagagac tggaatggat cggctacatc aaccctaca acgacggcac caagtacaac 240
 gagaagttca agggcagagc caccctgacc tccgacaagt ctgcctccac cgcctacatg 300
 gaactgtcct cctcgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgcca ctactacggc 360
 tcctccctgt ctatggacta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctctgctagc 420
 accaagggcc cctccgtggt tcctctggcc ccttgctcca gatecacctc cgagtctacc 480
 gccgctctgg gctgcctegt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 540
 tctggcgccc tgacctccgg cgtgcacaca tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 600
 tactccctgt cctccgtcgt gactgtgcct tcctctagcc tgggcacca gacctacacc 660
 tgtaacgtgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 720

ggccctcctt gccaccctg ccctgccct gaatttctgg gcggacctic cgtgttcctg 780
 tttccccaag agcccaagga caccctgat atctcccga cccccaagt gacctgcgtg 840
 gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 900
 gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 960
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag 1020
 gtgtccaaca agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1080
 ccccggaac cccagggtga cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1140
 gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1200
 tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttctcc tgtactctcg cctgaccgtg gacaagtccc ggtggcagga aggcaacgtg 1320
 ttctctgct ctgtgatgca cgaggccctg cacaaacct acaccagaa gtccctgtcc 1380
 ctgtctctgg gcaagtag 1398

<210> 75

<211> 702

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований легкий ланцюг клону 20E5, який містить гуманізовану способом PDI VL1

<400> 75

atggaatgga gcggcgtggt catgttcctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagcgac 60
 atccagatga cccagtcccc ctccagcctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc 120
 acctgtcggg cctcccagga catctccaac tacttgaact ggtatcagca gaagcccggc 180
 aaggccccc agctgctgat ctactacacc tcccggctgc actccggcgt gccctctaga 240
 ttttccggct ctggctcagg caccgactat accctgacca tcagctcctt gcagcccag 300
 gacttcgcca cctactactg ccagcagggc aacaccctgc cctggacctt tggccagggc 360
 accaaggtgg aatcaagcg gaccgtagcc gcccttccg tgttcatctt tccaccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtctgg caccgcttcc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 480
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccttgc agtccggcaa ctcccaggaa 540

agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660
 tctagccccg tgaccaagtc tttcaaccgg ggcgagtgtc ag 702

<210> 76
 <211> 702
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований легкий ланцюг клону 20E5, який містить гуманізовану способом PDL VL2

<400> 76
 atggaatgga gcgcggtgtt catgttctctg ctgtccgtga ccgcgggagt gcacagcgc 60
 atccagatga cccagtcctc ctccagcctg tctgcctctg tggcgacag agtgaccatc 120
 acctgtcggg cctcccagga catctccaac tacctgaact ggtatcagca gaaaccggc 180
 aaggccgtga agctgctgat ctactacacc tcccggctgc actccggcgt gccctctaga 240
 ttttccggct ctggctccgg caccgactat accctgacca tcagctcctt gcagcccag 300
 gacttcgcta cctacttctg tcagcaaggc aacaccctgc cctggacctt tggccagggc 360
 accaagggtg aaatcaagcg gaccgtagcc gcccttccg tgttcatctt tccaccctcc 420
 gacgagcagc tgaagtctgg caccgcttcc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 480
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaagggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 540
 agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 600
 tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660
 tctagccccg tgaccaagtc tttcaaccgg ggcgagtgtc ag 702

<210> 77
 <211> 1404
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 12H3, який містить гуманізовану способом PDL VH1

<400> 77

atggagctgg gcctgtcctg gatcttctcg ctggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gtcctccgt gaagggtgcc 120
 tgcaaggctt cggctacac ctccaaggac tacaccatgc actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacagggcc tggaatggat gggcggcatc taccetaaca acggcggctc cacctacaac 240
 cagaacttca aggatagagt gaccatcacc gccgacaagt ccacctccac gcctacatg 300
 gaactgtcct cctcgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgcccg gatgggctac 360
 cacggcccc acctggattt tgacgtgtgg ggcagggca ccacctgac cgtgtcctct 420
 gcttctacca agggcccctc cgtgttccct ctggcccctt gctccagatc cacctccgag 480
 tctaccgccg ctctgggctg cctcgtgaag gactacitcc ccgagcctgt gacagtgtcc 540
 tggaaactctg gcgccctgac ctctggcgtg cacaccttc cagctgtgct gcagtcctcc 600
 ggctgtact cctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctca gctctctggg caccaagacc 660
 tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 720
 aagtacggcc ctccctgcc tccttgcca gccctgaat ttctgggcgg acccagcgtg 780
 ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 840
 tgcgtgggtg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 900
 ggctggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagttaa cagcacctac 960
 cgggtgggtg ccgtgctgac cgtgctgac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
 tgcaagggtg ccaacaaggg cctgccttcc agcatcgaag agaccatctc caaggccaag 1080
 ggccagcccc gggaaccccc ggtgtacaca ctgcctcaa gccaggaaga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt cctgacctg tctcgtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgcctggaa 1200
 tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctgta ctctgcctg accgtggaca agtcccggtg gcaggaaggc 1320
 aacgtgttct cctgctcctg gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
 ctgtccctgt ctctgggaaa gtaa 1404

- <210> 78
- <211> 1404
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність КДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 12H3, який містить гуманізовану способом PDL VH2

<400> 78

```

atggagctgg gcctgtcctg gatcttcctg ctggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag      60
gtgcagctgg tgcaagtctg cgccgaagtg aagaaacccg gctcctccgt gaagggtgcc      120
tgcaaggctt cggctacac ctccaaggac tacaccatgc actgggtgcg acaggccctc      180
ggacagggcc tggaatggat cggcggcatc taccctaaca acggcggctc cacctacaac      240
cagaacttca aggatagagt gaccctgacc gccgacaagt ccacctccac cgcttacctg      300
gaactgtcct cctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgcccg gatgggctac      360
cacggccccc acctggattt tgactgtggt ggccagggca ccaccgtgac cgtgtcctct      420
gcttctacca agggccctc cgtgttcctt ctggccctt gctccagatc cacctccgag      480
tctaccgccg ctctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc      540
tggaactctg ggcacctgac ctctggcgtg cacaccittc cagctgtgct gcagtcctcc      600
ggcctgtact cctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccaagacc      660
tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct      720
aagtacggcc ctccctgccc tccttgccca gccctgaaat ttctgggcgg acccagcgtg      780
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc      840
tgctgtgtgg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtactgtggac      900
ggcgtggaag tgcaacaagc caagaccaag cctagagagg aacagtcaa cagcacctac      960
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag     1020
tgcaagggtg ccaacaaggg cctgccttcc agcatcgaaa agaccatctc caaggccaag     1080
ggccagcccc gggaaaccca ggtgtacaca ctgcctcaa gccaggaaga gatgaccaag     1140
aaccaggtgt cctgacctg tctcgtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgcctggaa     1200
tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc     1260
gacggctcct tcttctgta ctctgcctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc     1320
aacgtgttct cctgctcctg gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc     1380
ctgtccctgt ctctgggaaa gtaa                                             1404

```

<210> 79
 <211> 1404
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований важкий ланцюг IgG4 клону 12H3, який містить гуманізовану способом PDL VH3

<400> 79
 atggagctgg gctgtcctg gatcttcctg ctggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg aagaaacccg gctcctccgt gaagggtgcc 120
 tgcaaggctt ccggctacac cttcaaggac tacaccatgc actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacagggcc tggaatggat cggcggcatc taccctaaca acggcggctc cacctacaac 240
 cagaacttca aggatcgggc caccctgacc gtggacaagt ccacctctac cgcttaccatg 300
 gaactgtcct ccctgcggag cgaggacacc gccgtgtact actgtgcccg gatgggctac 360
 cacggccccc acctggattt tgacgtgtgg ggccagggca ccacctgac agtgtcctct 420
 gcttccacca agggcccctc cgtgtttcct ctggcccctt gctccagatc cacctccgag 480
 tctaccgccc ctctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcctgt gaccgtgtcc 540
 tggaaactctg ggcctctgac ctctggcgtg cacaccttcc ctgctgtgct gcagtctagc 600
 ggctgtact ccctgtcctc cgtcgtgacc gtgccttcca gctctctggg caccaagacc 660
 tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct 720
 aagtacggcc ctccctgccc tccttgccc gccctgaat ttctgggagg accttccgtg 780
 ttctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 840
 tgcgtgggtgg tggatgtgtc ccaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 900
 ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtcaa cagcacctac 960
 cgggtgggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
 tgcaagggtgt ccaacaaggg cctgcctagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag 1080
 ggccagcccc gggaaaccca ggtgtacaca ctgcctccaa gccaggaaga gatgaccaag 1140
 aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa 1200
 tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctgta ctctcggctg acagtggata agagccggtg gcaggaaggc 1320
 aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
 ctgtccctgt ctctgggaaa gtaa 1404

<210> 80
 <211> 711
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований легкий ланцюг клону 12Н3, який містить гуманізовану способом PDL VI1

<400> 80
 atggacatgc ggggtccccg tcagctgctg ggattgctgc tgctgtggtt cccaggcgcc 60
 agatgcgaca tccagatgac ccagtcccc tccagcctgt ctgcctctgt gggcgacaga 120
 gtgaccatca catgcaaggc ctcccaggac gtgggagccg ccgtggcctg gtatcagcag 180
 aagcctggca agggccccaa gctgctgac tactgggcct ctaccagaca caccggcgtg 240
 ccctccagat tctccggctc tggctctggc accgaactta ccctgaccat cagctccctg 300
 cagccccagg acttcgccac ctactactgc cagcagtaca tcaactacc cctgacctc 360
 ggccggaggca ccaaggtgga aatcaagcgg accgtggccg ctccctcctg gttcatcttc 420
 ccaccttccg acgagcagct gaagtccggc accgcttctg tcgtgtgcct gctgaacaac 480
 ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg aagggtggaca acgccctgca gtccggcaac 540
 tcccaggaat ccgtgaccga gcaggactcc aaggacagca cctactcct gtccctcacc 600
 ctgaccctgt ccaaggccga ctacgagaag cacaaggtgt acgcctgcga agtgaccac 660
 cagggcctgt ctgccccctg gaccaagtct ttcaaccggg gcgagtgcta a 711

<210> 81
 <211> 711
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність кДНК, оптимізована для *Cricetulus griseus*, що кодує гуманізований легкий ланцюг клону 12Н3, який містить гуманізовану способом PDL VI2

<400> 81

atggacatgc gggtgccccg tcagctgctg ggattgctgc tgctgtgggt cccaggcgcc 60
 agatgcgaca tccagatgac ccagtccccc tccagcctgt ctgcctctgt gggcgacaga 120
 gtgaccatca catgcaaggc ctcccaggac gtgggagccg ccgtggcttg gtatcagcag 180
 aagcctggca aggcccccaa gctgctgata tactgggcct ctaccagaca caccggcgtg 240
 cccgacagat tctctggcgg cggatctggc accgacttta ccctgacat cagctccctg 300
 cagccccagg acttcgccac ctactactgc cagcagtaca tcaactacc cctgacctc 360
 ggcggaggca ccaagggtga aatcaagcgg accgtggccg ctccctccgt gttcatcttc 420
 ccaccttccg acgagcagct gaagtccggc accgcttctg tcgtgtgcct gctgaacaac 480
 ttctaccccc gcgaggccaa ggtgcagtgg aagggtggaca acgccctgca gtccggcaac 540
 tcccaggaat ccgtgaccga gcaggactcc aaggacagca cctactccct gtccctccacc 600
 ctgacctgt ccaaggccga ctacgagaag cacaaggtgt acgccctgca agtgaccac 660
 cagggcctgt ctgccccgt gaccaagtct ttcaaccggg gcgagtgcta a 711

<210> 82

<211> 465

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга IgG4 клону 20E5,

що містить гуманізовану способом PDL VH1

<400> 82

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

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

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

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

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
 465

- <210> 83
- <211> 465
- <212> PRT
- <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга IgG4 клону 20E5,

що містить гуманізовану способом PDL VH2

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

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

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

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

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 86

<211> 233

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга клону 20E5, що містить гуманізовану способом PDL VL2

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

Gln Asn Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp
115 120 125

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

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

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

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

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

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

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

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

12H3,

що містить гуманізовану способом PDL VH2

<400> 88

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Asn Phe Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp
115 120 125

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

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

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

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

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

	195						200							205	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
	210						215							220	
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
	225					230				235					240
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
					245					250					255
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260						265					270	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
		275						280					285		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290					295						300			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
	305					310						315			320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					325					330					335
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
					340				345						350
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		355						360						365	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		370				375						380			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	385					390					395				400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				405					410						415

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

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

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

Leu Gly Lys
 465

<210> 89

<211> 467

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга IgG4 клону 12H3,

що містить гуманізовану способом PDI VH3

<400> 89

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Asn Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Lys
 465

<210> 90

<211> 236

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга клону 12H3,
 що містить гуманізовану способом PDL VL1

<400> 90

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 91
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність гуманізованого легкого ланцюга клону 12H3,
 що містить гуманізовану способом PDL VL2

<400> 91

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

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

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 92

<211> 88

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність A1-B1-модуля CRD4

<400> 92

Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys
 1 5 10 15

Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala
 20 25 30

Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr
 35 40 45

Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln
 50 55 60

Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro
 65 70 75 80

Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
 85

<210> 93
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL1 клону 20E5

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL2 клону 20E5

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

<210> 95

<211> 108

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність, гуманізована способом PDL варіабельної області легкого ланцюга VL1 клону 12H3

<400> 95

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
 20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr 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

<220>
 <223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого антитіла 20E5

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (48)..(48)
 <223> може також являти собою Met

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (68)..(68)
 <223> може також являти собою Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (70)..(70)
 <223> може також являти собою Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (74)..(74)
 <223> може також являти собою Thr

<400> 97

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого антитіла 20E5

<220>
<221> VARIANT
<222> (44)..(44)
<223> Може також являти собою Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> (87)..(87)
<223> Може також являти собою Tyr

<400> 98

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

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

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

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

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

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

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

<210> 99

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (48)..(48)
 <223> Може також являти собою Met

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (68)..(68)
 <223> Може також являти собою Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (70)..(70)
 <223> Може також являти собою Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (72)..(72)
 <223> Може також являти собою Ala

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 100

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3

<220>

<221> VARIANT

<222> (60)..(60)

<223> Може також являти собою Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (65)..(65)

<223> Може також являти собою Ser

<400> 100

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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
 20 25 30

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

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

Gly 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 Ile Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 101
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 101

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 102
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 102

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 103
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 103

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 104
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 105

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 106

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 106

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 107

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 107

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 108
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла
 <400> 108
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

115

<210> 110

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 111

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 112

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 113

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 113

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 114

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 114

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 115

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 115

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 116

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 117
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла
 <400> 117
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

115

<210> 119
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 119

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 120
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 120

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 121

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 121

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 122

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 122

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 123

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 124

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 124

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 125

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr

20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Glu Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 126
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла
 <400> 126
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Glu Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

115

120

<210> 128
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 128

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 129
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 129

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 130

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 130

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 131

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 131

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 132

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 132

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 133

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 133

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 134

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> Може також являти собою Leu

<220>

<221> VARIANT
 <222> (48)..(48)
 <223> Може також являти собою Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (56)..(56)
 <223> Може також являти собою Gly, Ala, Ser або Glu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (68)..(68)
 <223> Може також являти собою Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (70)..(70)
 <223> Може також являти собою Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (74)..(74)
 <223> Може також являти собою Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (106)..(106)
 <223> Може також являти собою Leu або Ile

<400> 134

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 135
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 135

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

Lys Gly

<210> 136
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 136

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

Gly

<210> 137
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 137

<210> 141
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 141

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

Asp

<210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 142

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

Asp

<210> 143
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR2 антитіла

<400> 143

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

Asp

<210> 144
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR3 антитіла

<400> 144

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

<210> 145
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність CDR3 антитіла

<400> 145

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

<210> 146
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 146

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 147

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 147

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 148
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 148

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 149
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 149

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 150

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

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

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

		35				40					45				
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						95
Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 151
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<400> 151

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 152
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність важкого ланцюга антитіла

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (11)..(11)
 <223> Може також являти собою Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (48)..(48)
 <223> Може також являти собою Ile

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (55)..(55)
 <223> Може також являти собою Gln, Ala або Glu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (68)..(68)
 <223> Може також являти собою Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (70)..(70)
 <223> Може також являти собою Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (72)..(72)
 <223> Може також являти собою Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (99)..(99)
 <223> Може також являти собою Leu або Ile

<400> 152

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

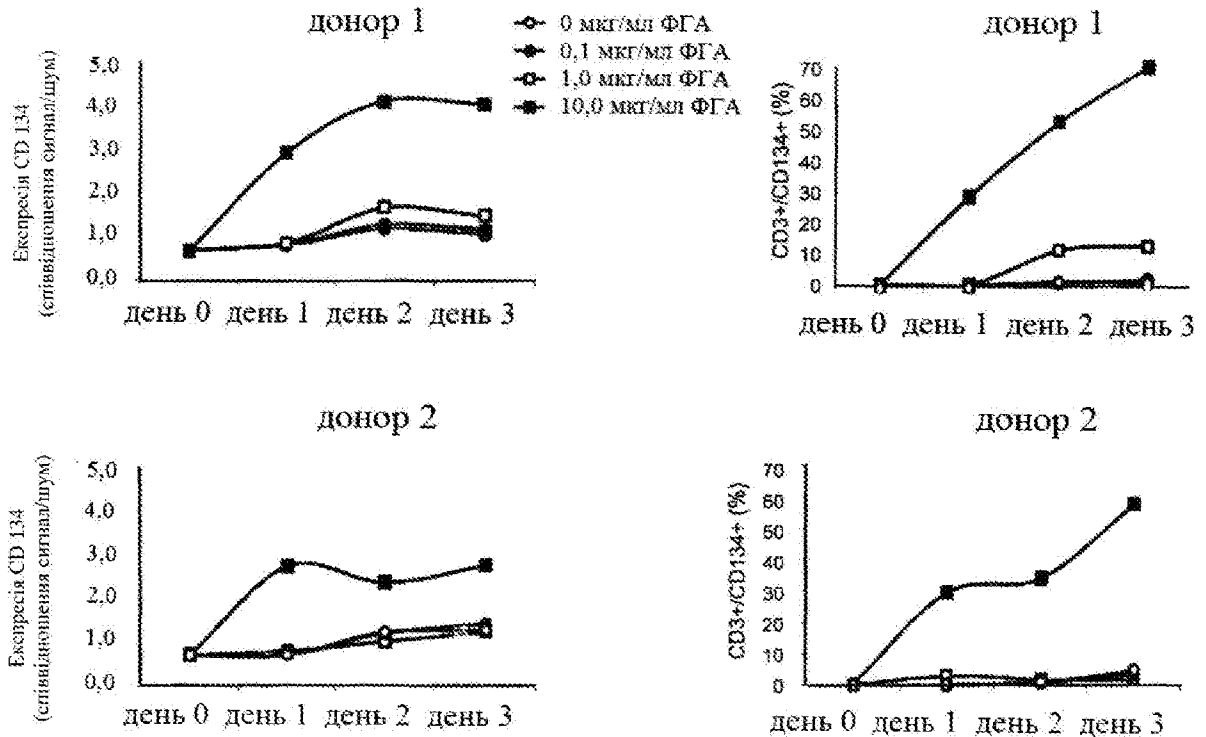
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене гуманізоване антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) з SEQ ID NO: 98 і варіабельну область важкого ланцюга (VH) з SEQ ID NO: 134.
2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 97.
3. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що ділянка HCDR3 варіабельної області важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, 139 або 140.
4. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що ділянка HCDR2 варіабельної області важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, 135, 136, 137 або 138.
5. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що ділянка HCDR1 варіабельної області важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.
6. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що:
 - a) зазначена VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62 або 63; і зазначена VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64, 65, 66, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 149, 150 або 151, яка в деяких випадках містить 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків 11, 56 або 106 VH; або
 - b) зазначені VL і VH містять амінокислотні послідовності,
 - i) SEQ ID NO: 62 і 64, відповідно,
 - ii) SEQ ID NO: 62 і 65, відповідно,
 - iii) SEQ ID NO: 62 і 66, відповідно,
 - iv) SEQ ID NO: 63 і 64, відповідно,
 - v) SEQ ID NO: 63 і 65, відповідно, або
 - vi) SEQ ID NO: 63 і 66, відповідно.
7. Антитіло за п. 6, яке **відрізняється** тим, що зазначена VL містить SEQ ID NO: 63, і зазначена VH містить SEQ ID NO: 66.
8. Антитіло за п. 6, яке **відрізняється** тим, що зазначені 1, 2 або 3 амінокислотні заміни в лінійних положеннях амінокислотних залишків VH являють собою V11L, D56G, D56A, D56S, D56E, M106L або M106I.
9. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD134 людини, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 92.
10. Антитіло за будь-яким із пп. 1-9, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло являє собою деімунізоване антитіло.
11. Антитіло за будь-яким із пп. 1-10, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло являє собою агоніст CD134.
12. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло являє собою антитіло ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
13. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло містить заміну в Fc-області.
14. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначена заміна модулює зв'язування зазначеного антитіла з Fc-гамма рецептором (FcγR) або з неонатальним Fc-рецептором (FcRn).
15. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що зазначена заміна включає заміну S267E/L328F, заміну E233D/G237D/H268D/P271G/A330R, заміну V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S або заміну M252Y/S254T/T256E, де нумерація залишків наведена відповідно до EU Index.
16. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що кодує VH і VL за будь-яким із пп. 1-15.
17. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 16.
18. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 17, для експресії антитіла за п. 1
19. Спосіб підсилення імунної відповіді в суб'єкта, який включає введення зазначеному суб'єкту, що має в цьому потребу, антитіла за будь-яким із пп. 1-15, протягом часу, достатнього для підсилення імунної відповіді.
20. Спосіб лікування раку в суб'єкта, який включає введення зазначеному суб'єкту, що потребує такого лікування, антитіла за будь-яким із пп. 1-15, протягом часу, достатнього для лікування зазначеного раку.
21. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що зазначений рак являє собою рак передміхурової залози, рак товстої кишки, рак легенів, гематобластоз, меланому або рак сечового міхура.

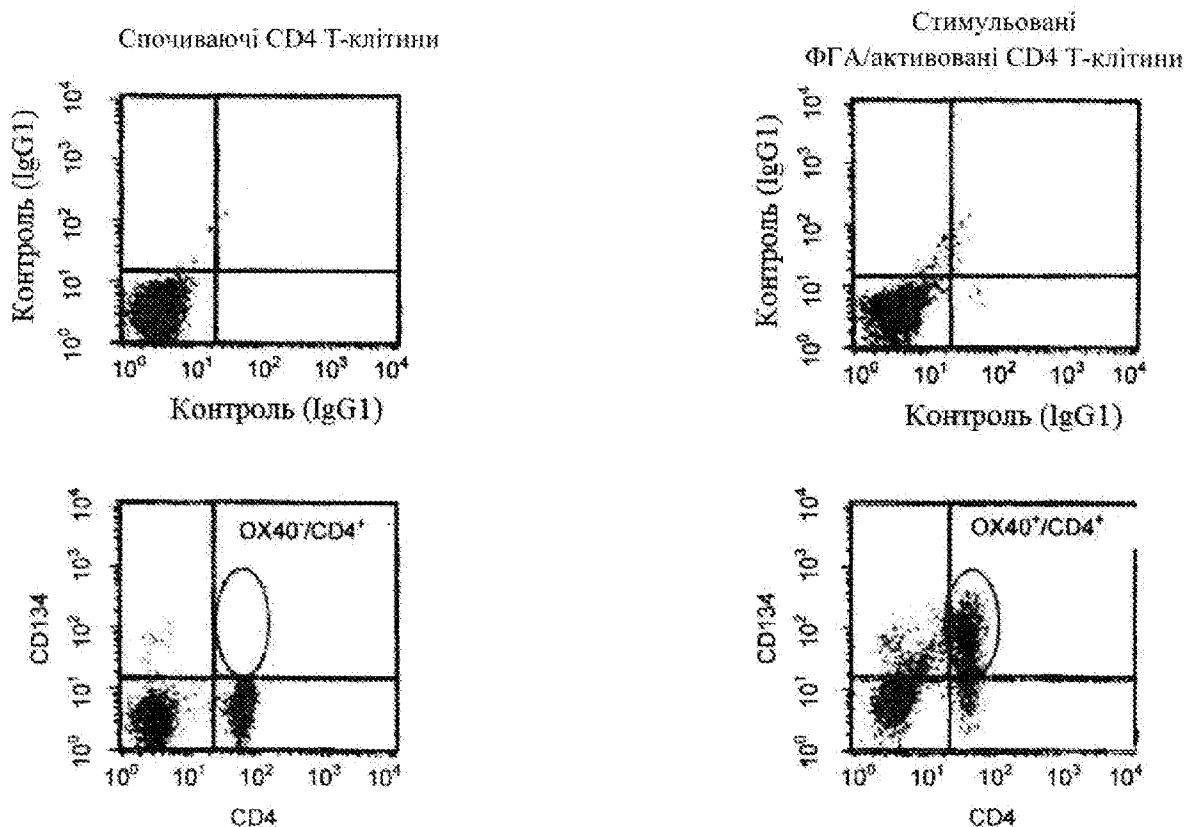
22. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким із пп. 1-15 і фармацевтично прийнятій носій.

23. Виділене агоністичне антитіло, яке зв'язується з CD134 людини, що містить варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка містить області, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) LCDR1, LCDR2 і LCDR3, і варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка містить області, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) HCDR1, HCDR2 і HCDR3, при цьому зазначене антитіло містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3, що має послідовності:

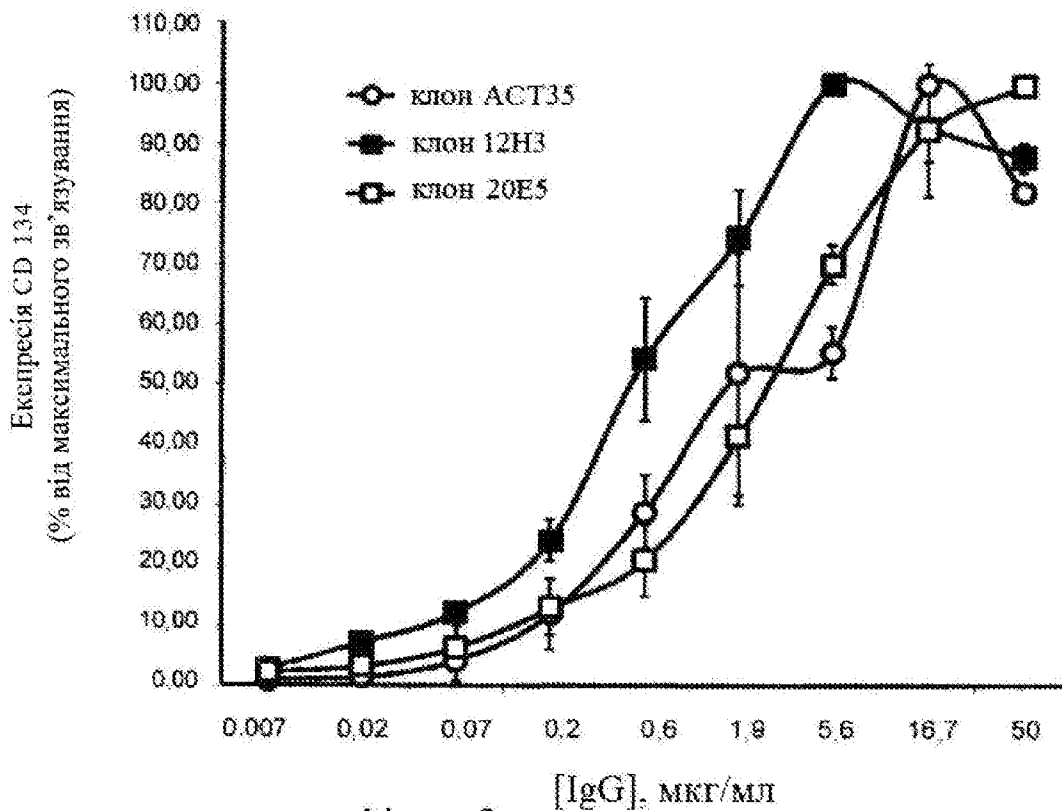
- a) SEQ ID NO: 6, 7, 139, відповідно,
- b) SEQ ID NO: 6, 7, 140, відповідно,
- 5 c) SEQ ID NO: 6, 135, 8, відповідно,
- d) SEQ ID NO: 6, 135, 139, відповідно,
- 10 e) SEQ ID NO: 6, 135, 140, відповідно,
- f) SEQ ID NO: 6, 136, 8, відповідно,
- g) SEQ ID NO: 6, 136, 139, відповідно,
- 15 h) SEQ ID NO: 6, 136, 140, відповідно,
- i) SEQ ID NO: 6, 137, 8, відповідно,
- j) SEQ ID NO: 6, 137, 139, відповідно,
- k) SEQ ID NO: 6, 137, 140, відповідно,
- l) SEQ ID NO: 6, 138, 8, відповідно,
- 20 m) SEQ ID NO: 6, 138, 139, відповідно, або
- n) SEQ ID NO: 6, 138, 140, відповідно, і при цьому
- o) зазначена LCDR1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9,
- p) зазначена LCDR2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10; і
- q) зазначена LCDR3 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.



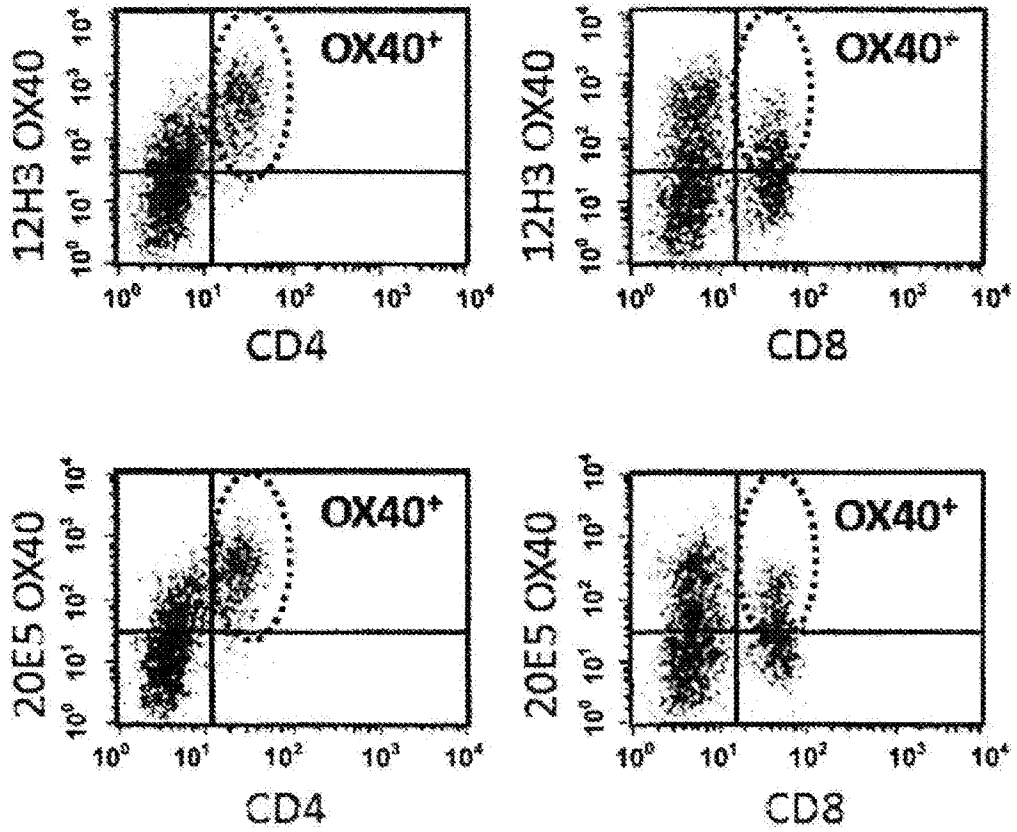
Фігура 1



Фігура 2



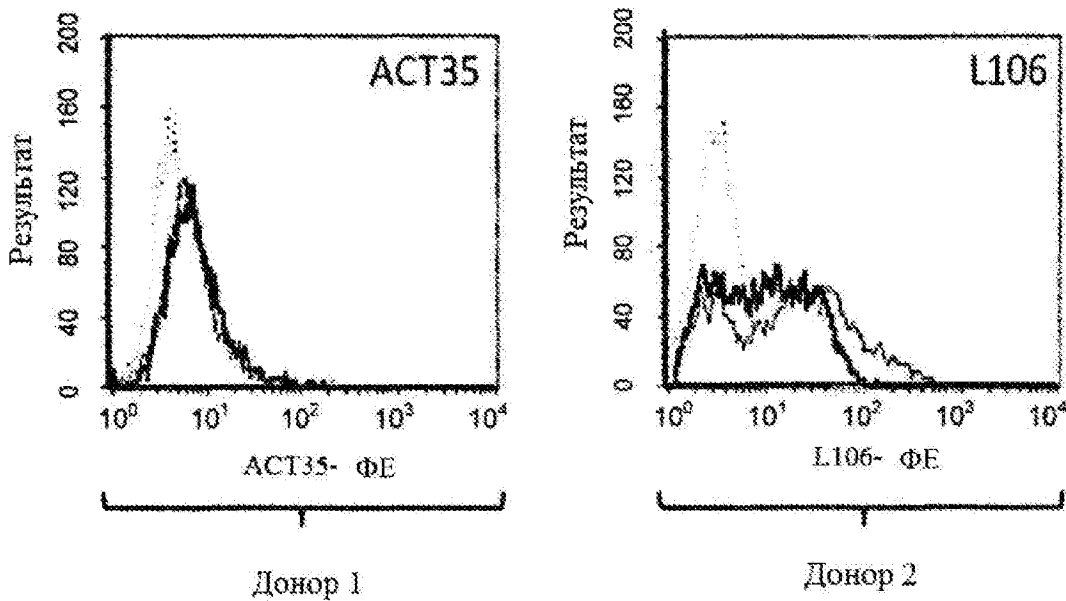
Фігура 3



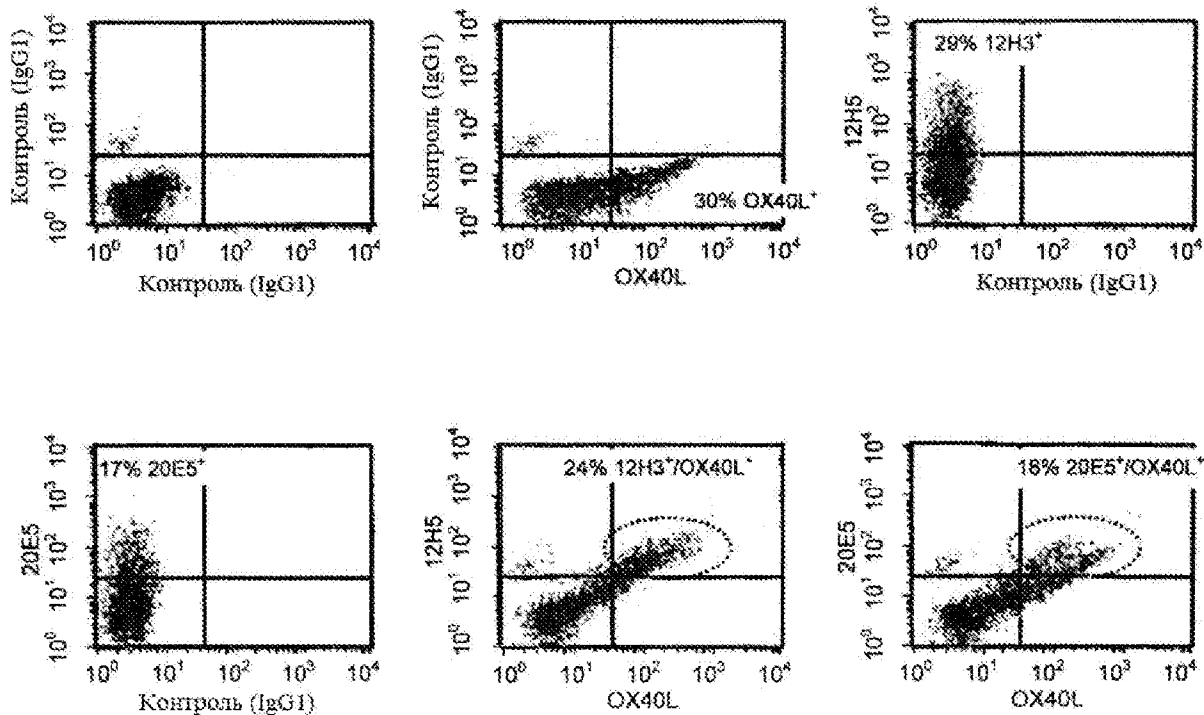
Фігура 4

..... фон
 Клон ACE 35 або L 106,
 кон'югований з ФЕ,
 сам по собі

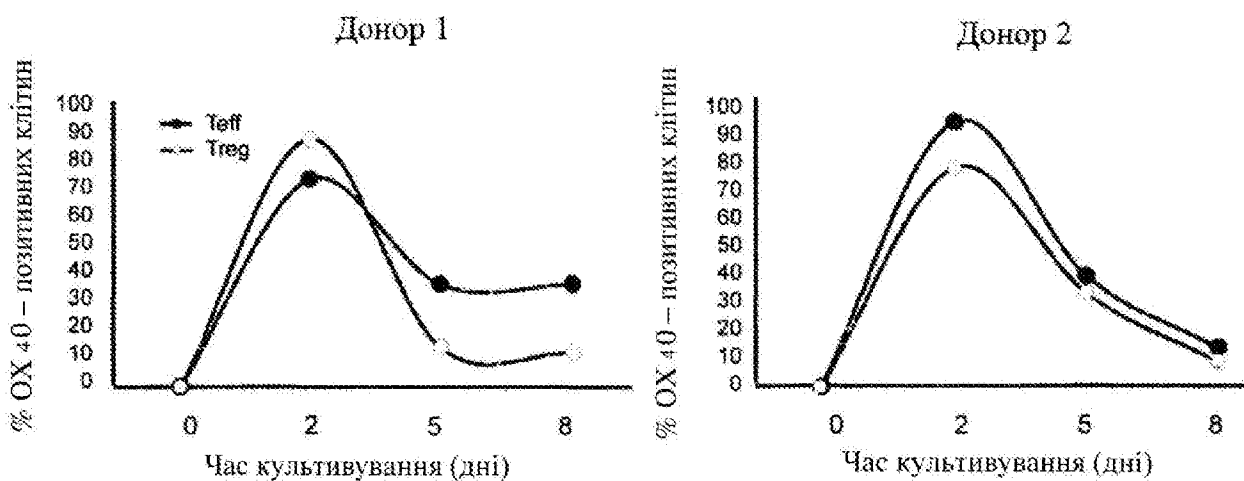
———— попередня інкубація з клоном 12H3
 ————— попередня інкубація з клоном 20E5



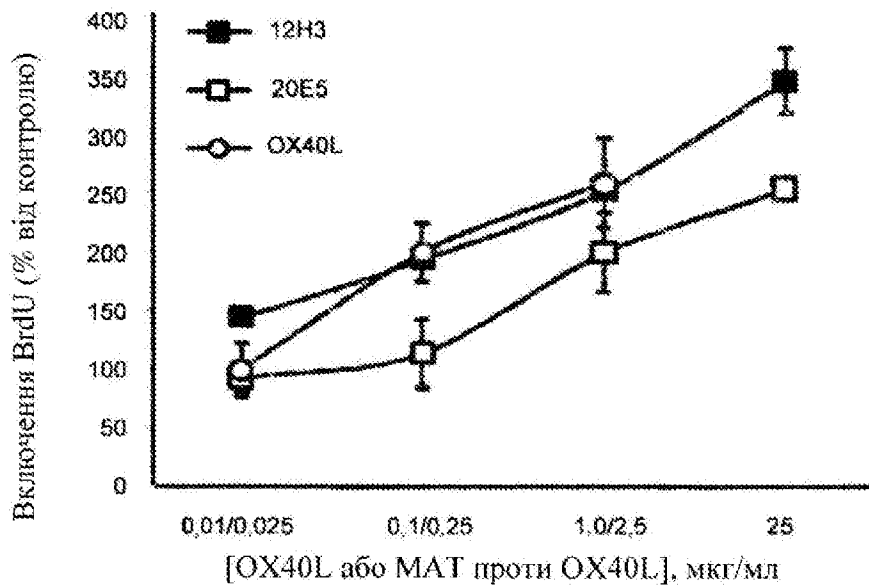
Фігура 5



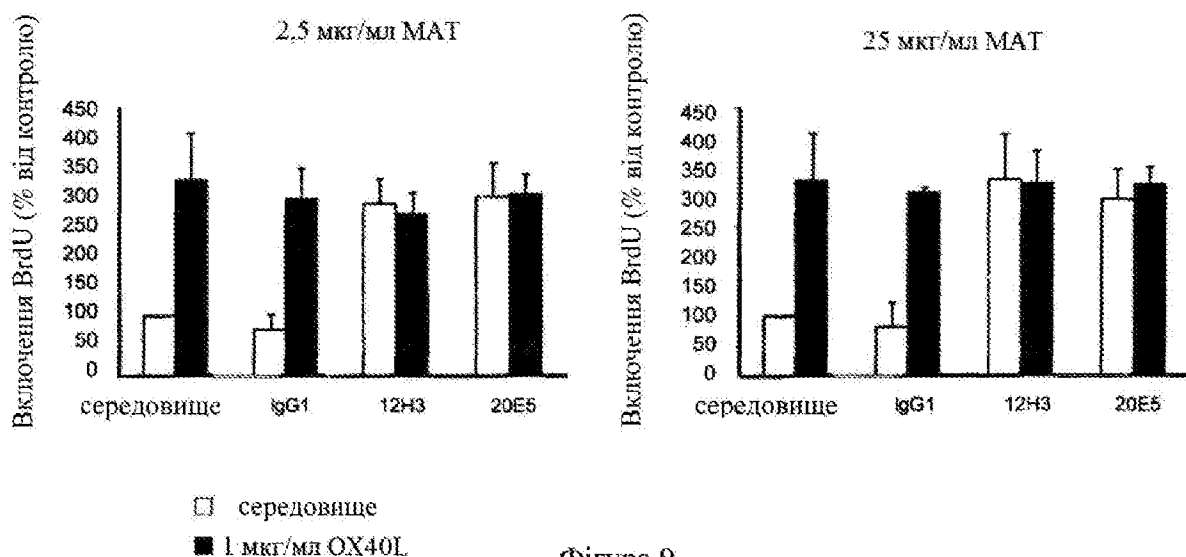
Фігура 6



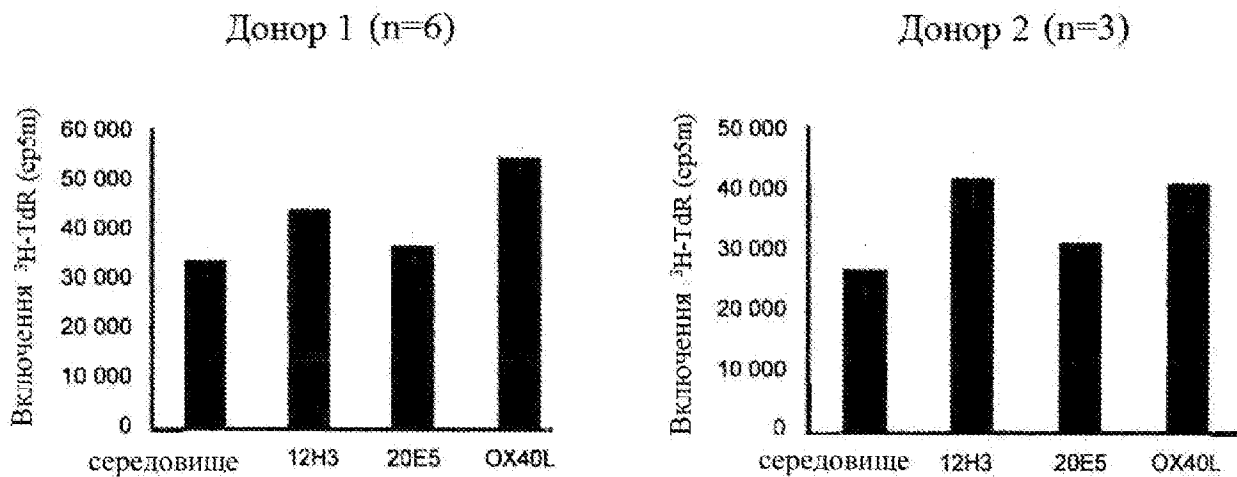
Фігура 7



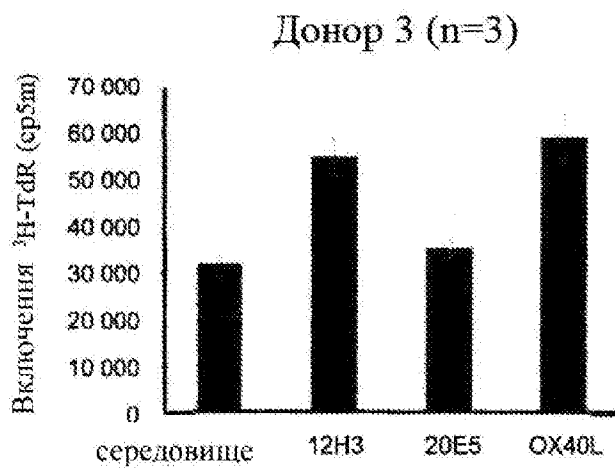
Фігура 8



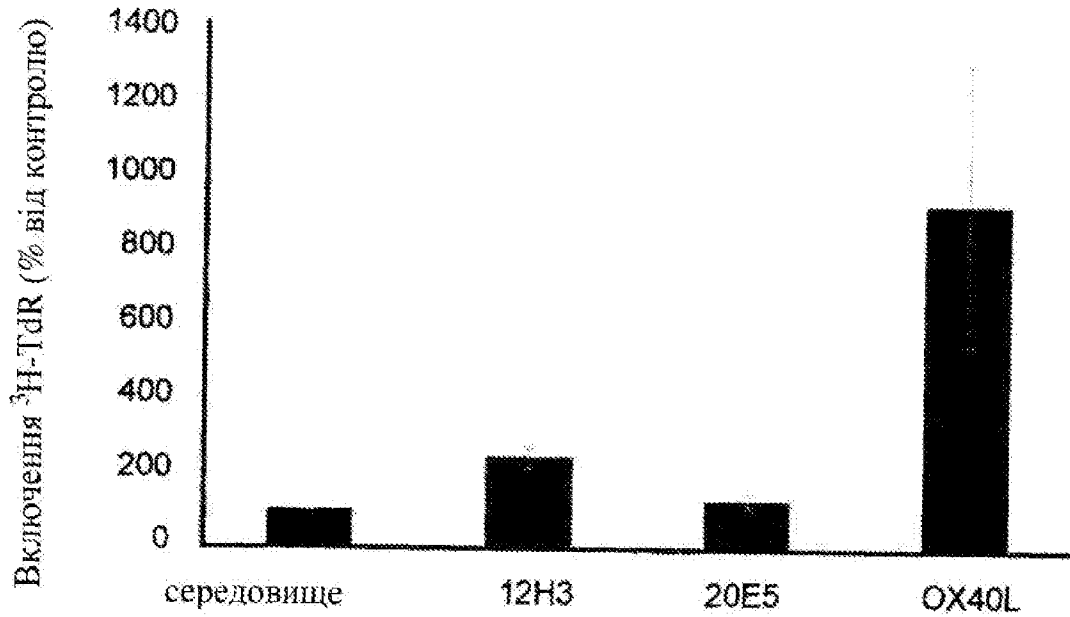
Фігура 9



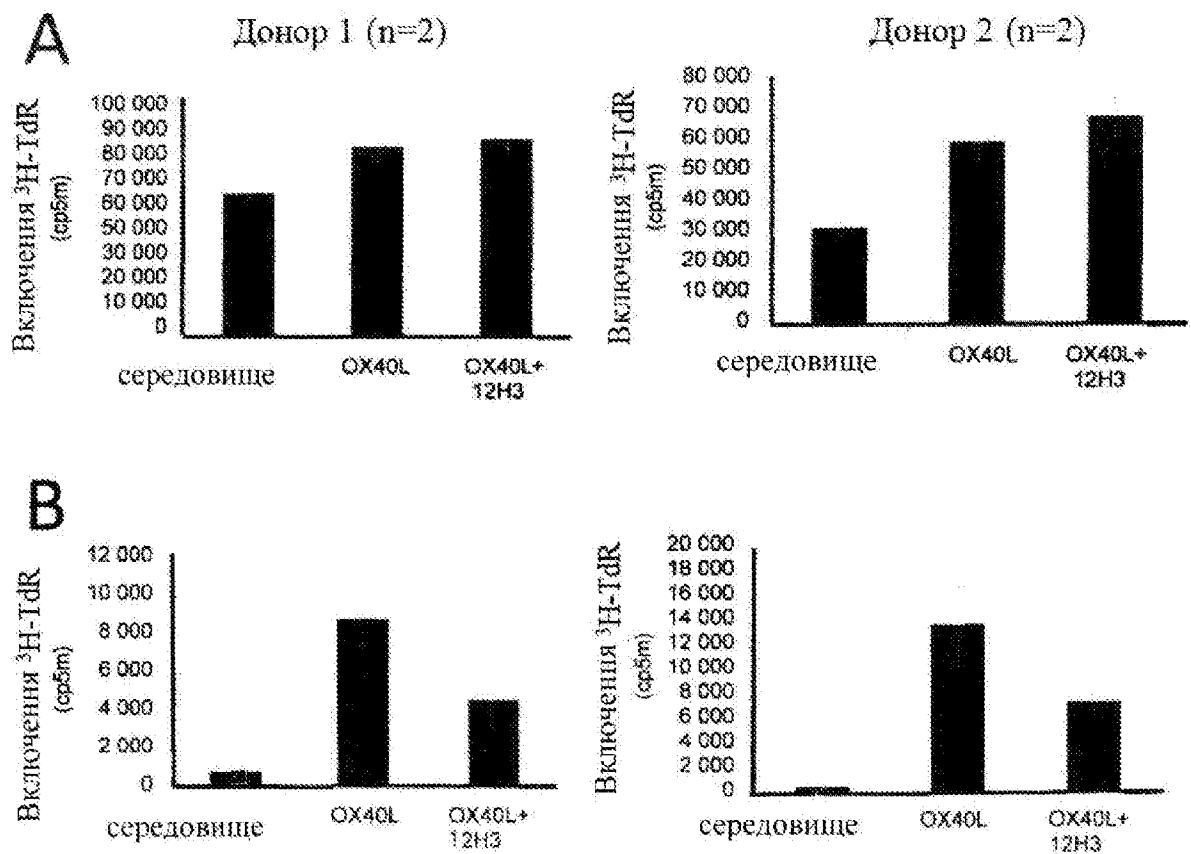
Фігура 10



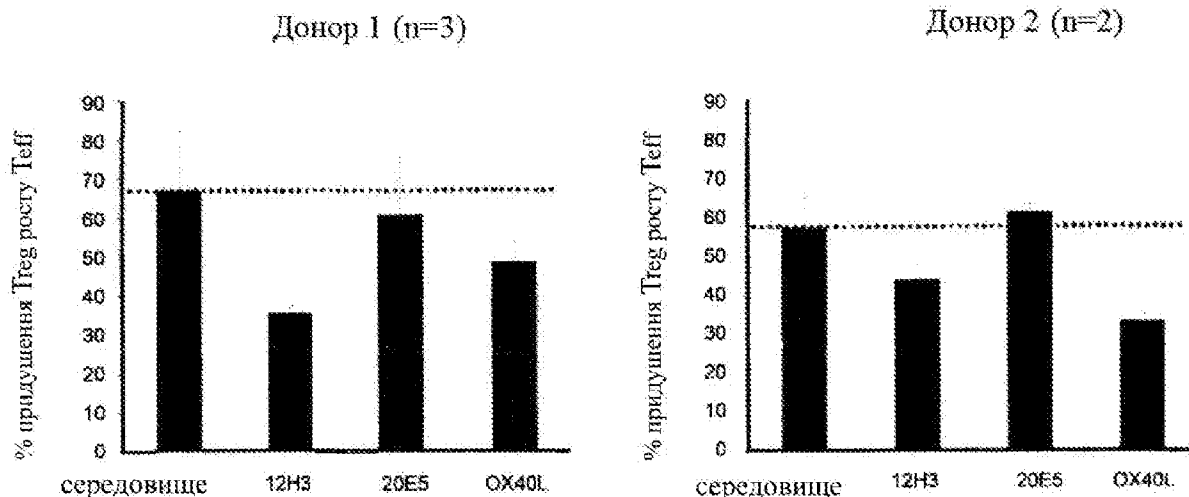
Фігура 10 (продовження)



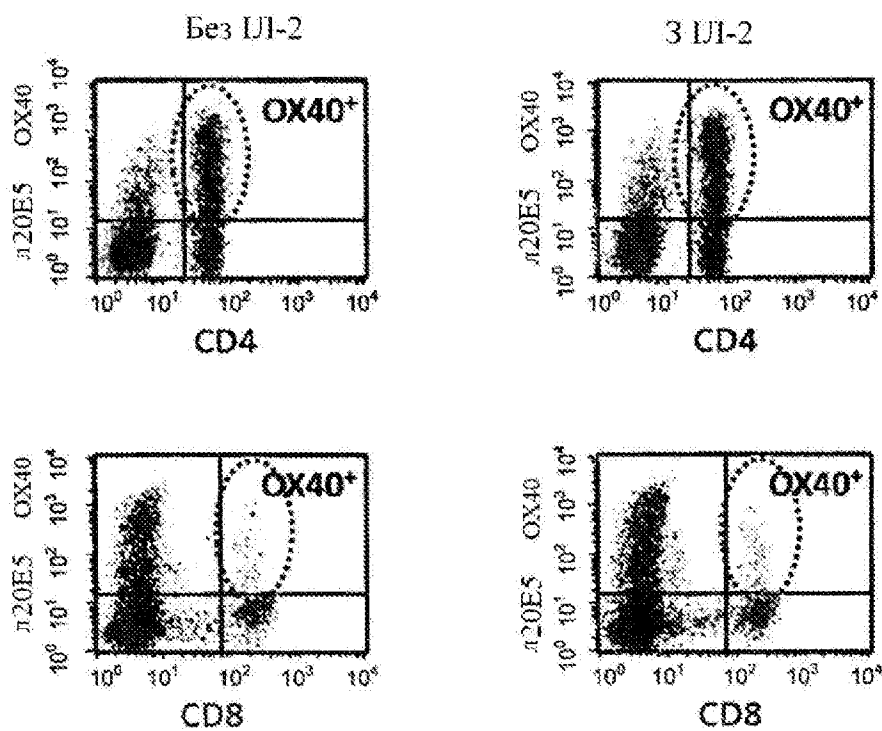
Фігура 11



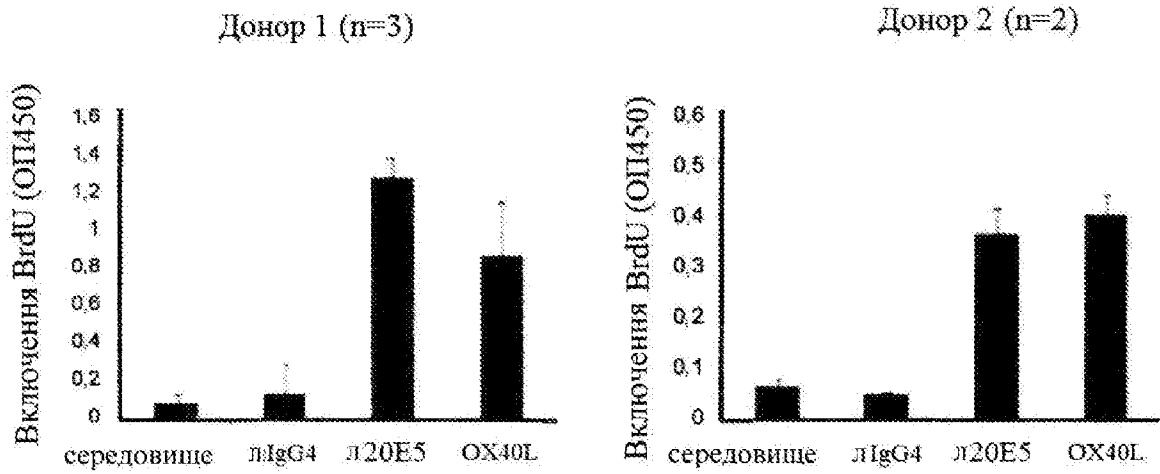
Фігура 12



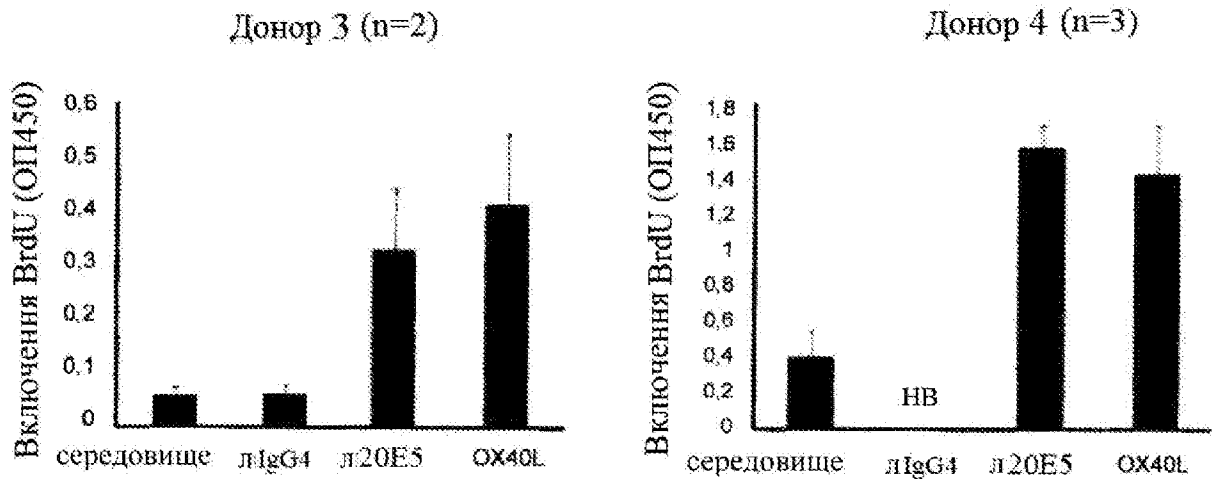
Фігура 13



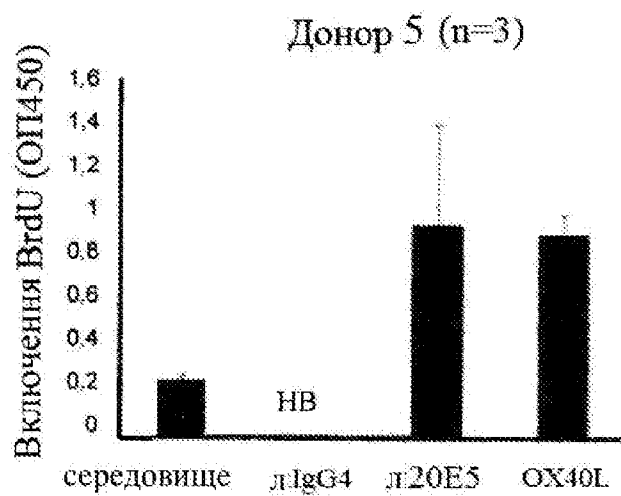
Фігура 14



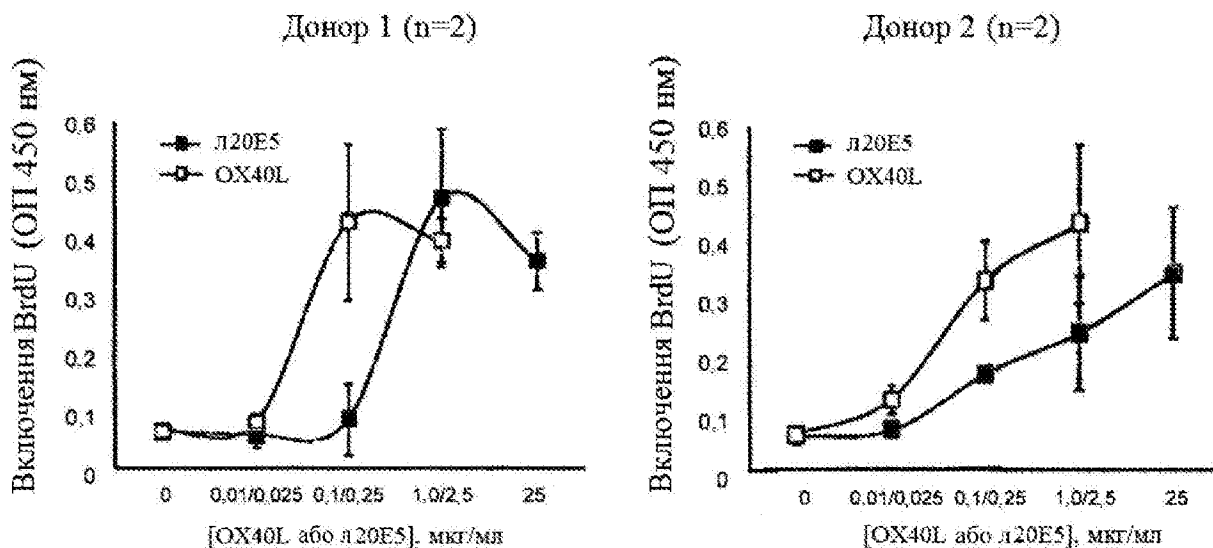
Фігура 15



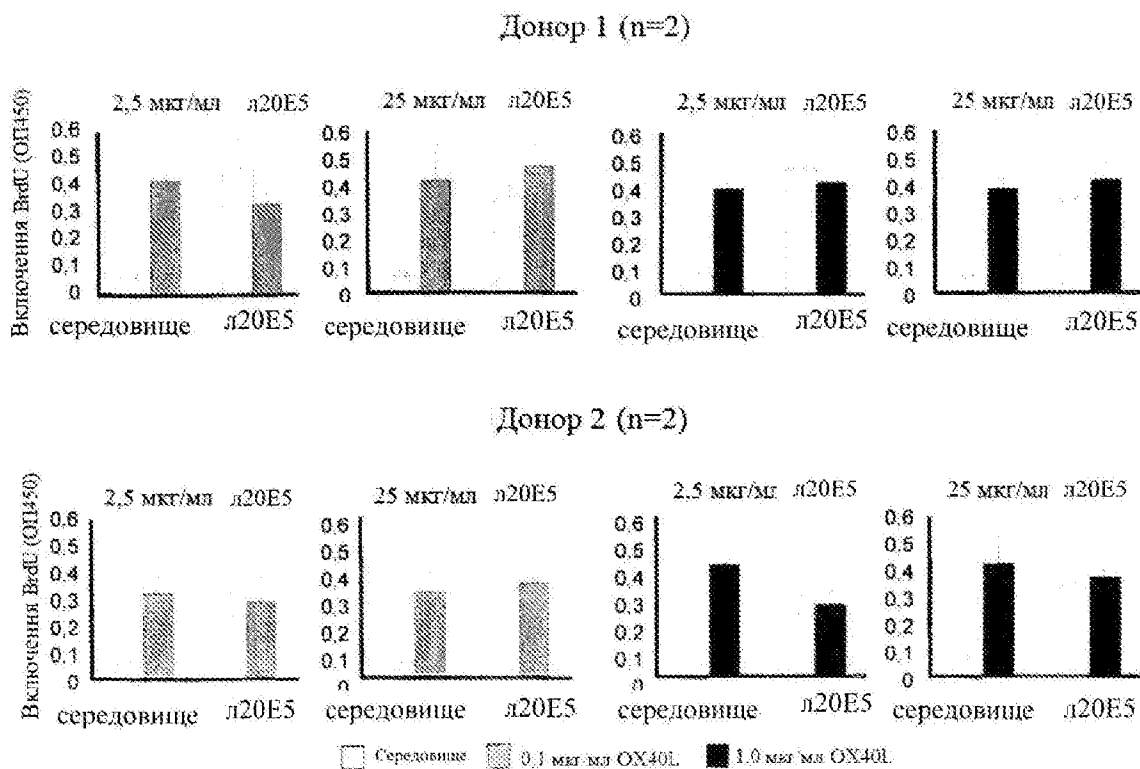
Фігура 15 (продовження)



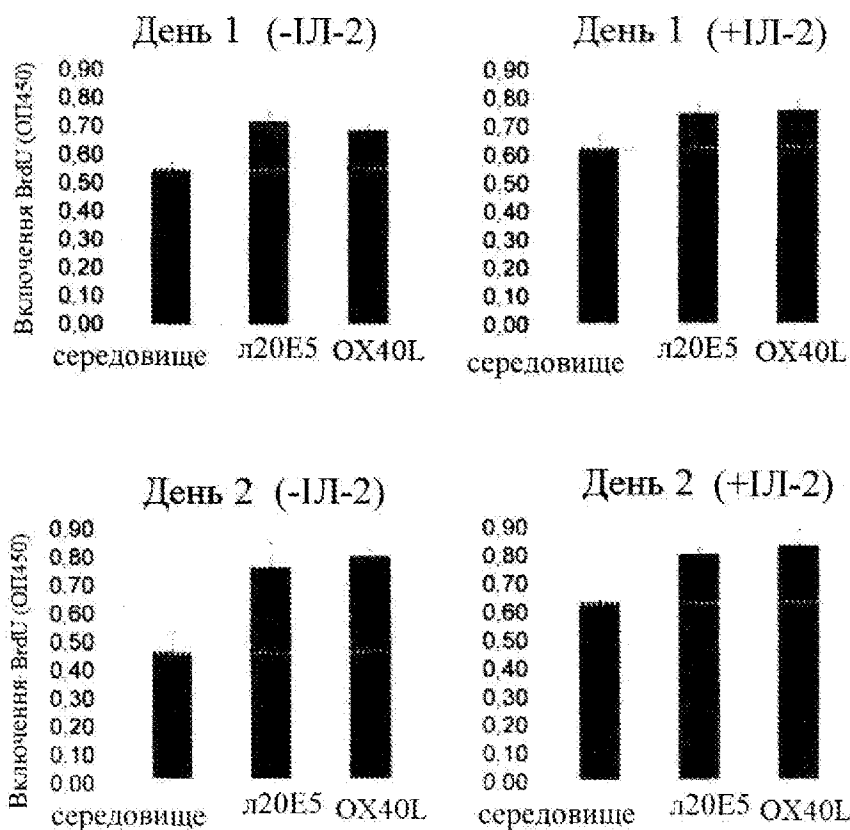
Фігура 15 (продовження)



Фігура 16



Фігура 17

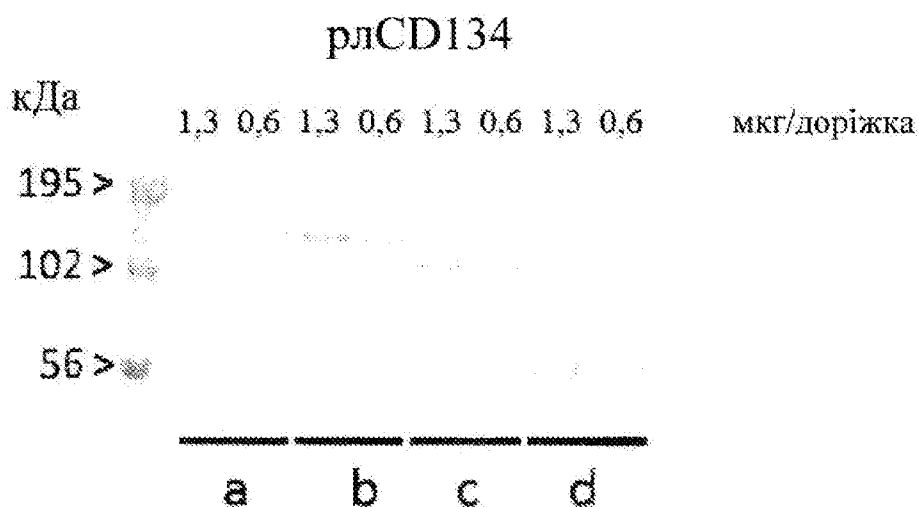


Фігура 18

A

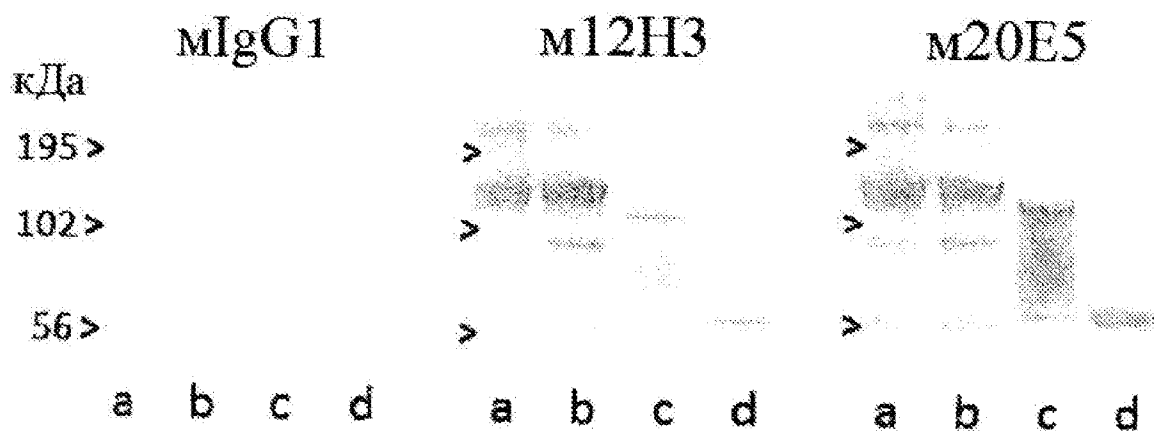
	редук. умови	нагрівання, 70 °C
a	-	-
b	-	+
c	+	-
d	+	+

B



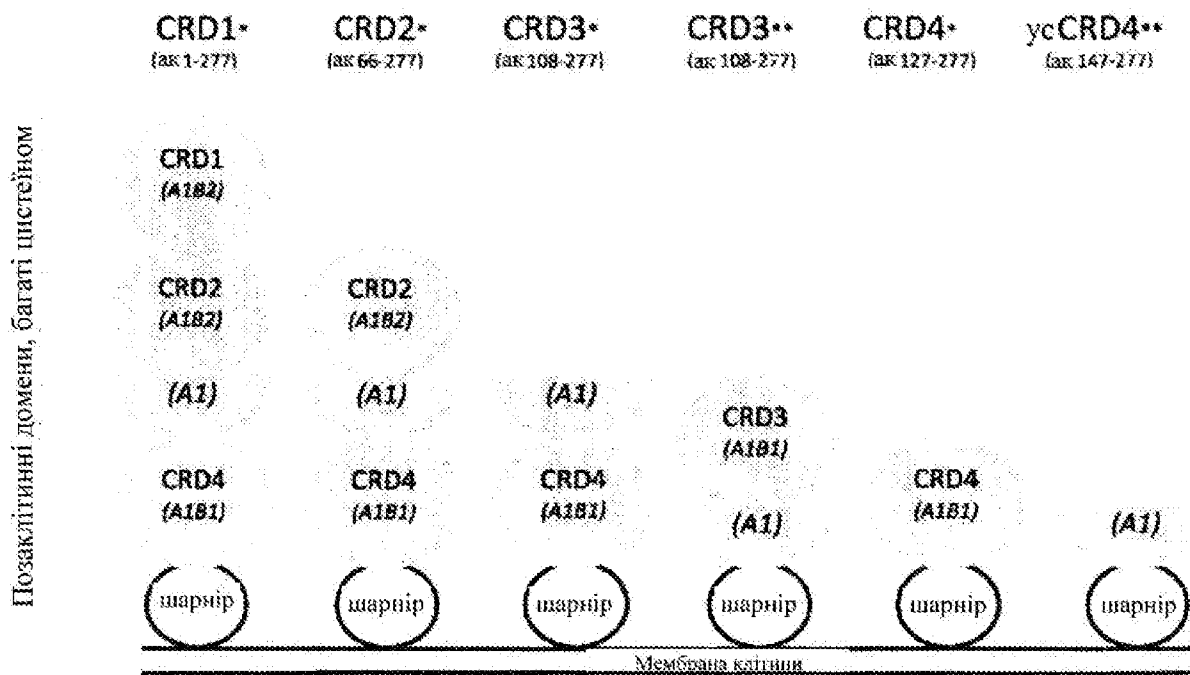
Фігура 19

C



Фігура 19 (продовження)

Конструкції рлCD134

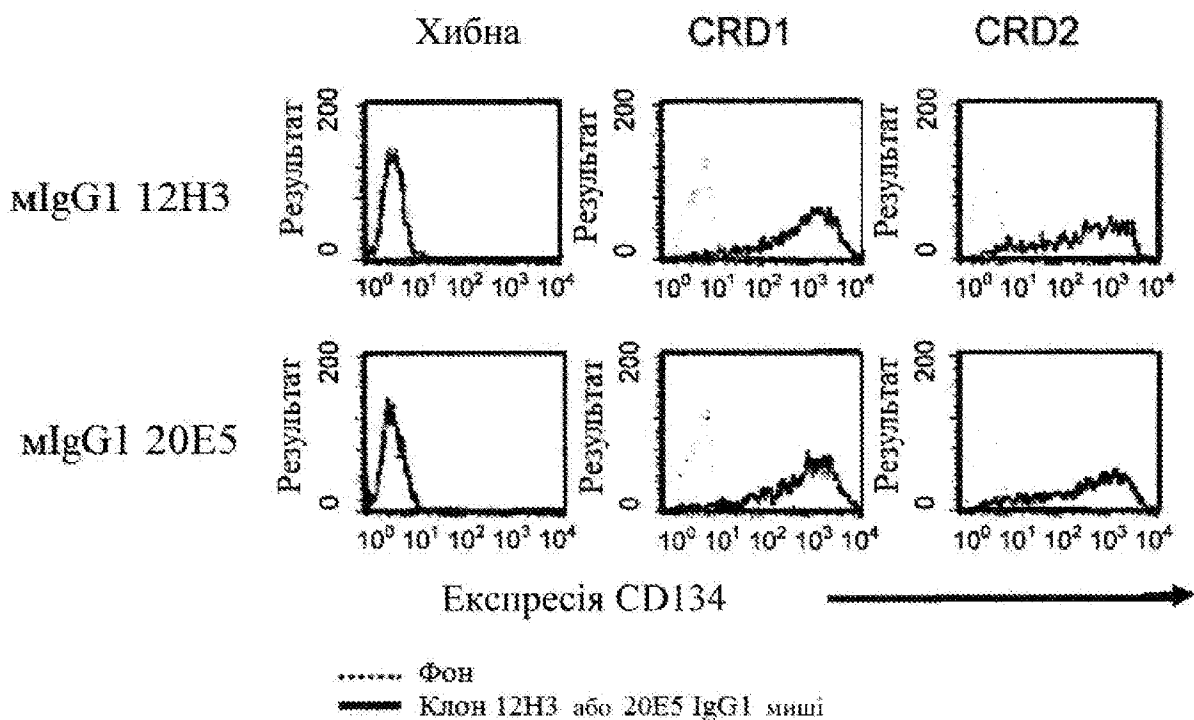


Позаклітинні домени, багаті цистеїном

* Згідно Latza et al. Eur J Immunol 1994
 ** Згідно Compagnon et al. Structure 2006

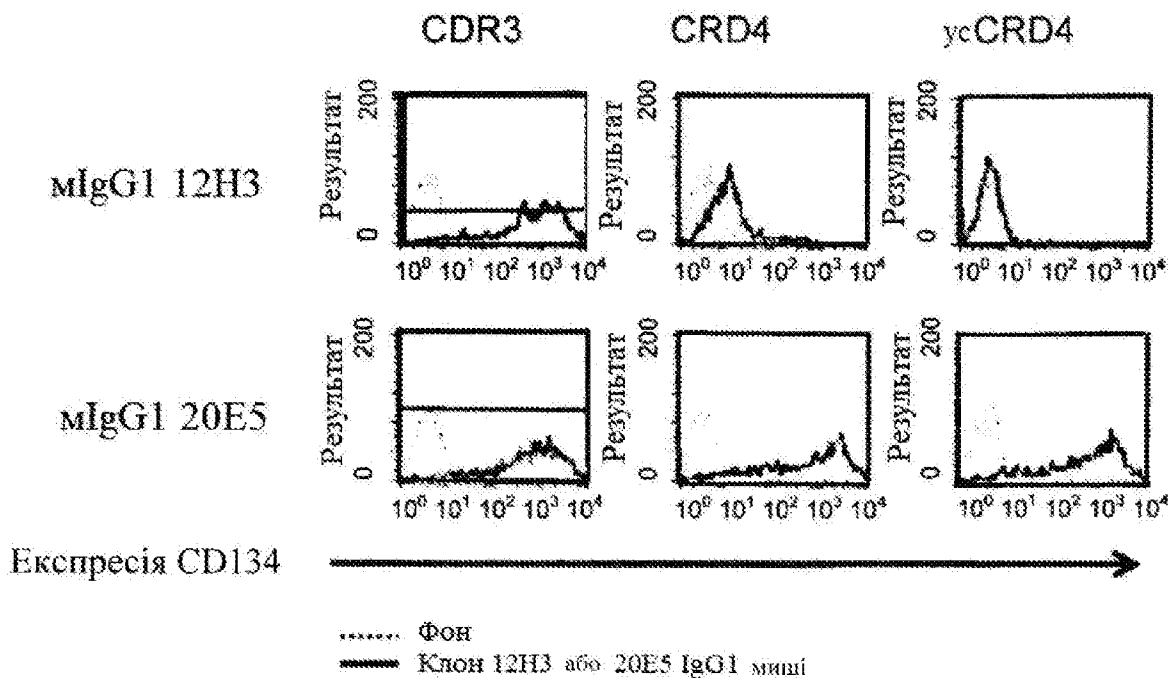
Фігура 20

Конструкції лCD134



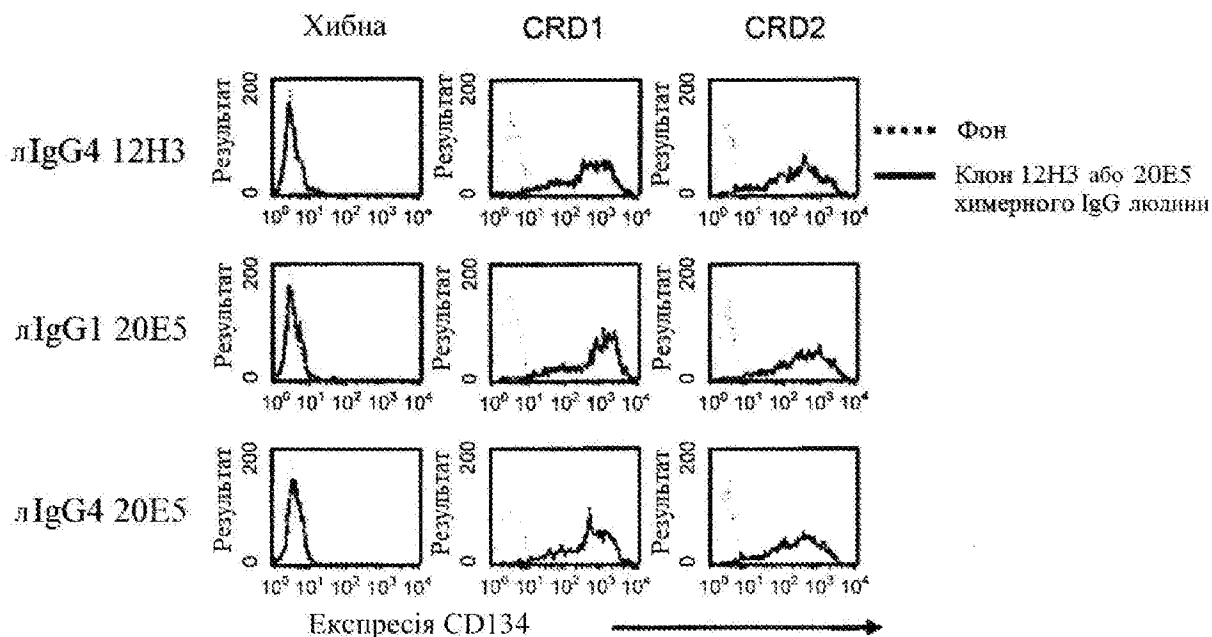
Фігура 21

Конструкції лCD134



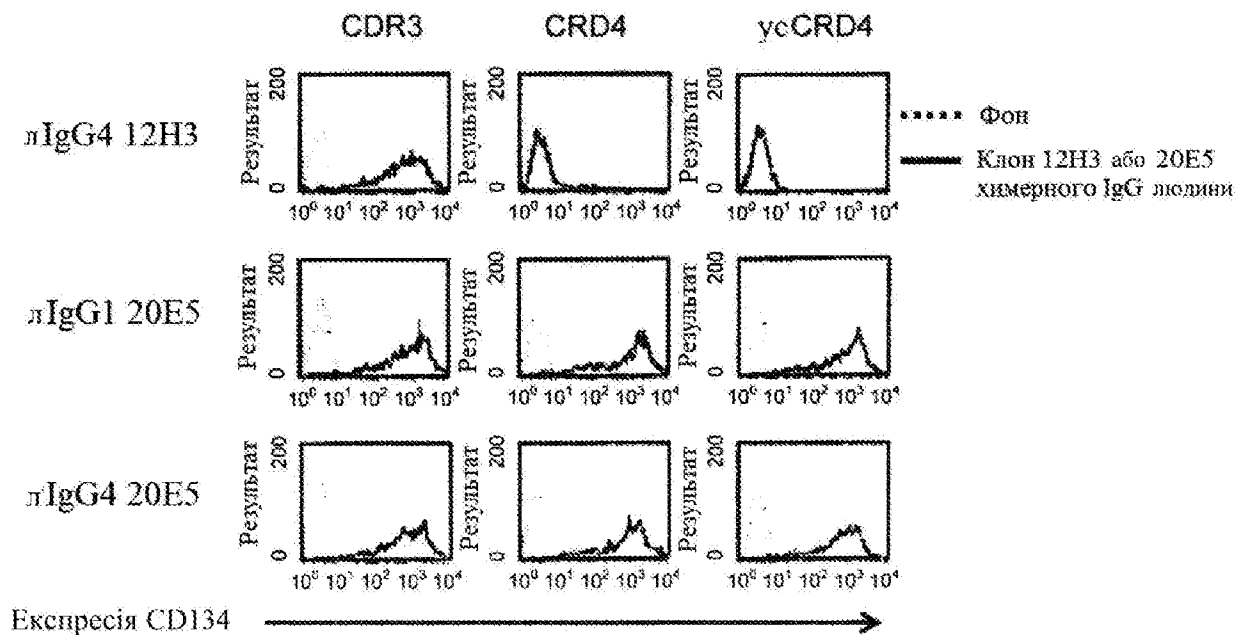
Фігура 21 (продовження)

Конструкції лCD134

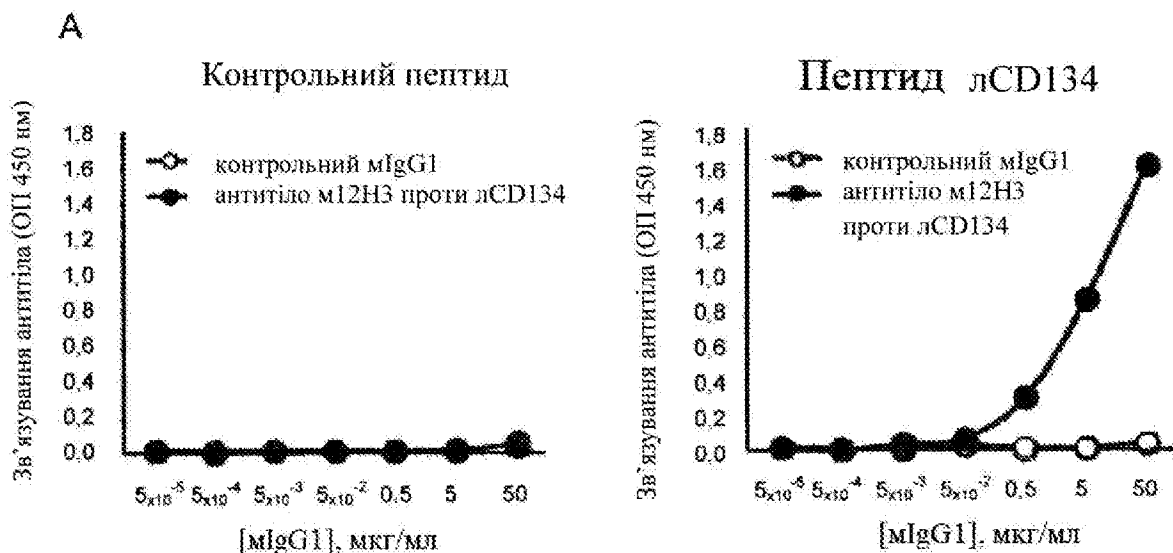


Фігура 22

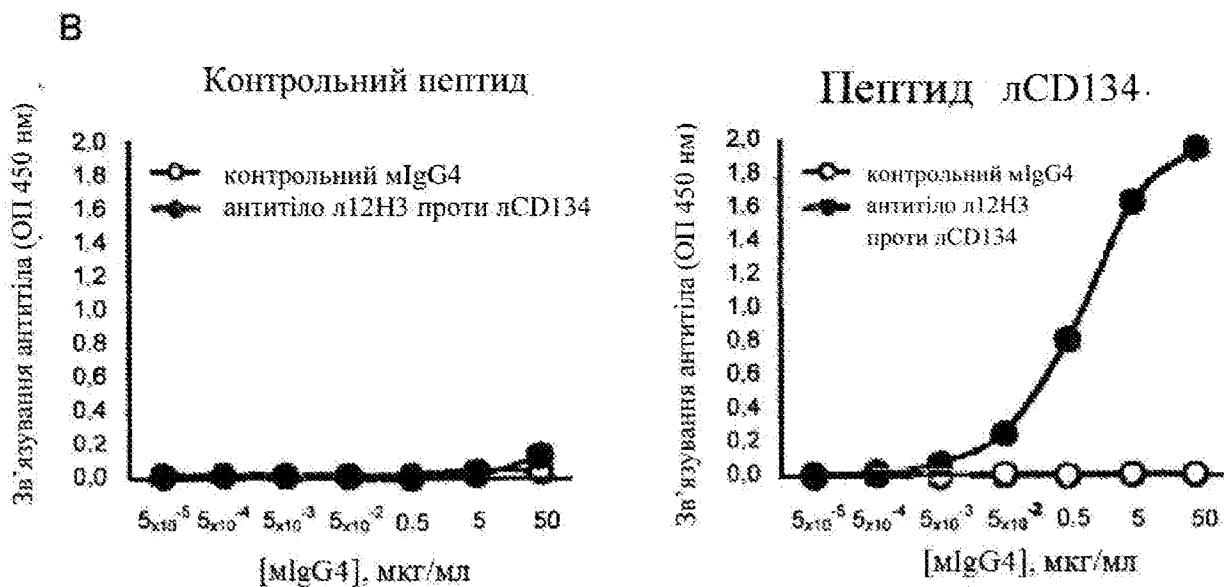
Конструкції лCD134



Фігура 22 (продовження)



Фігура 23



Фігура 23 (продовження)

Фігура 24

M2085V0
 H 2085_01
 H 2085_02
 H 2085_03

M2085V0
 H 2085_01
 H 2085_02
 H 2085_03

M2085V0
 H 2085_01
 H 2085_02

M2085V1
 H 2085_01
 H 2085_02

H 2085_01 = SEQ 61
 H 2085_02 = SEQ 63
 H 2085_03 = SEQ 64
 H 2085_04 = SEQ 65
 H 2085_05 = SEQ 66

M1283V0
 H 1283_01
 H 1283_02
 H 1283_03

M1283V0
 H 1283_01
 H 1283_02
 H 1283_03

M1283V1
 H 1283_01
 H 1283_02

M1283V1
 H 1283_01
 H 1283_02

H 1283_01 = SEQ 67
 H 1283_02 = SEQ 68
 H 1283_03 = SEQ 69
 H 1283_04 = SEQ 70
 H 1283_05 = SEQ 71

Фігура 25

Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого антитіла 20E5 (SEQ ID NO: 97)

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFY SYVMH WVRQA PGQRL EWX₁GY INPYN DGTKY NEKFK GRX₂TX₃ TSDX₄S
ASTAY MELSS LRSED TAVYV CANYY GSSLS MDYWG QGTLV TVSS₂

де X₁ = I або M,
X₂ = A або V,
X₃ = L або I i
X₄ = K або T

Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого антитіла 20E5 (SEQ ID NO: 98)

DIQMT QSPSS LSASV GDRVY ITCPA SQQIS NYLNV YQCKP GKAK₃K LLIYY TBRLL SGVFS RFSGS GSGTD YTLTI
SSLQP EDFAT YX₅CCQ GNTLP WTEGQ GTKVE IKR

де X₅ = V або P i
X₆ = F або Y

Фігура 26

Варіабельна область важкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3 (SEQ ID NO: 99)

QVQLV QSGAE VKKPG SSVKV SCKAS GYTFK DYTMH WVRQA PGQGL EWX₇GG IYRNN GSGTY NQNFK GRX₈TX₉ TX₁₀DKS
TSTAY MELSS LRSED TAVYV CARMG YHGPH LQFDV WGGQT TVTVS S₂

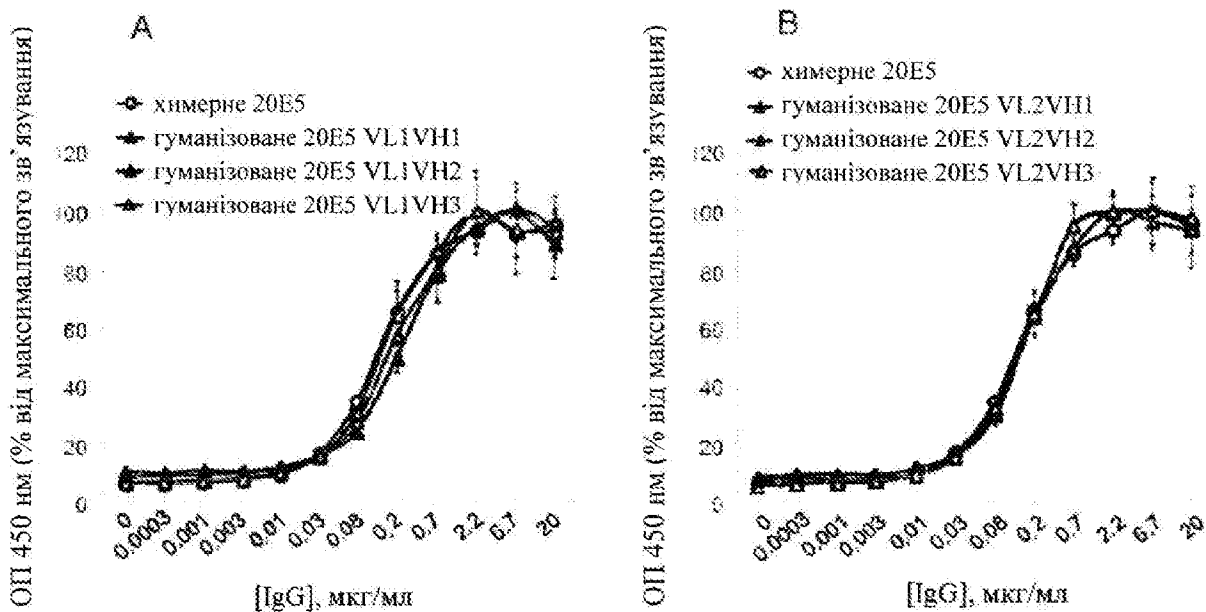
де X₇ = I або M,
X₈ = A або V,
X₉ = L або I i
X₁₀ = V або A

Варіабельна область легкого ланцюга гуманізованого антитіла 12H3 (SEQ ID NO: 100)

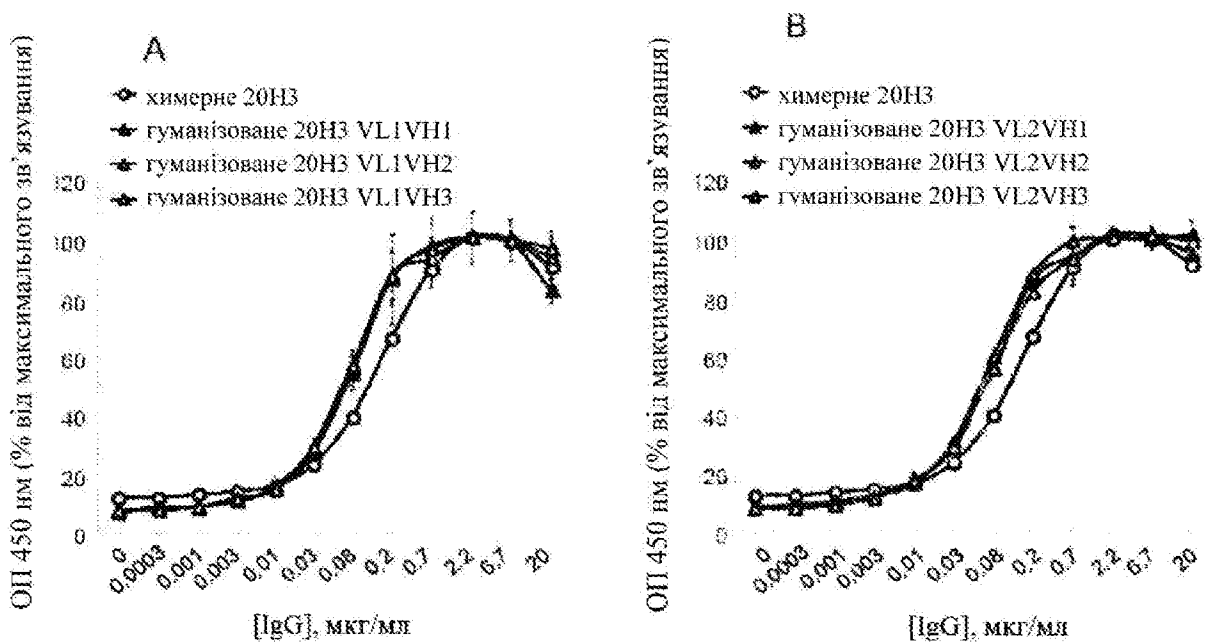
DIQMT QSPSS LSASV GDRVY ITCPA SQDVG AAVAV YQCKP GKAPK LLIYW ASTRH TGVPK₁₁ RFSGX₁₂ GSGTD FTLTI
SSLQP EDFAT YQCQQ YINYP LTEGG GTKVE IKR

де X₁₁ = D або S i
X₁₂ = G або S

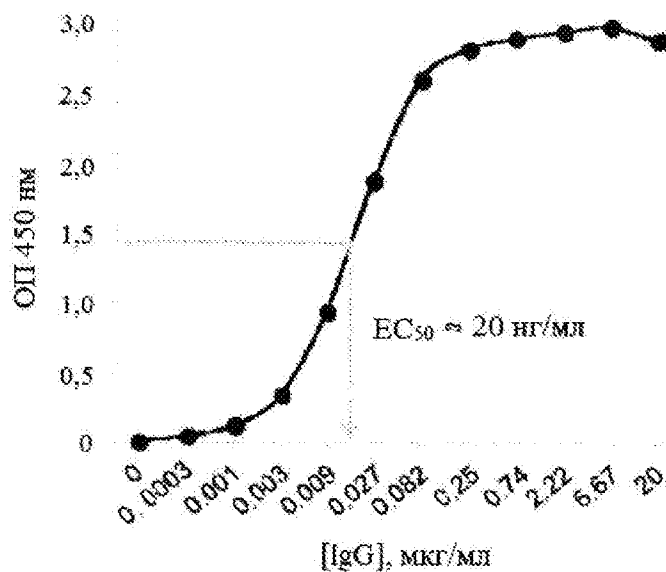
Фігура 27



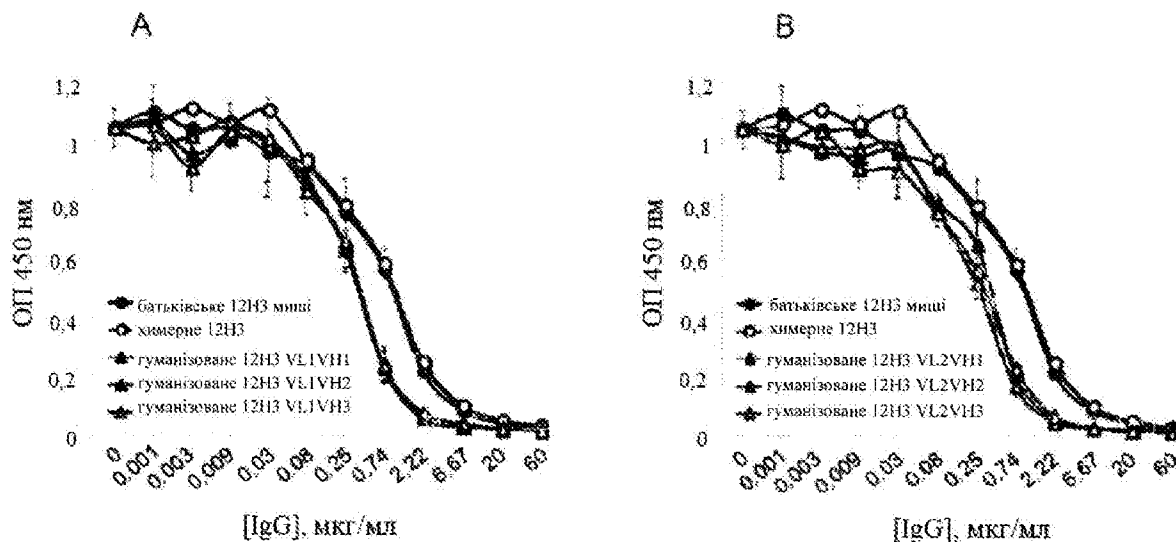
Фігура 28



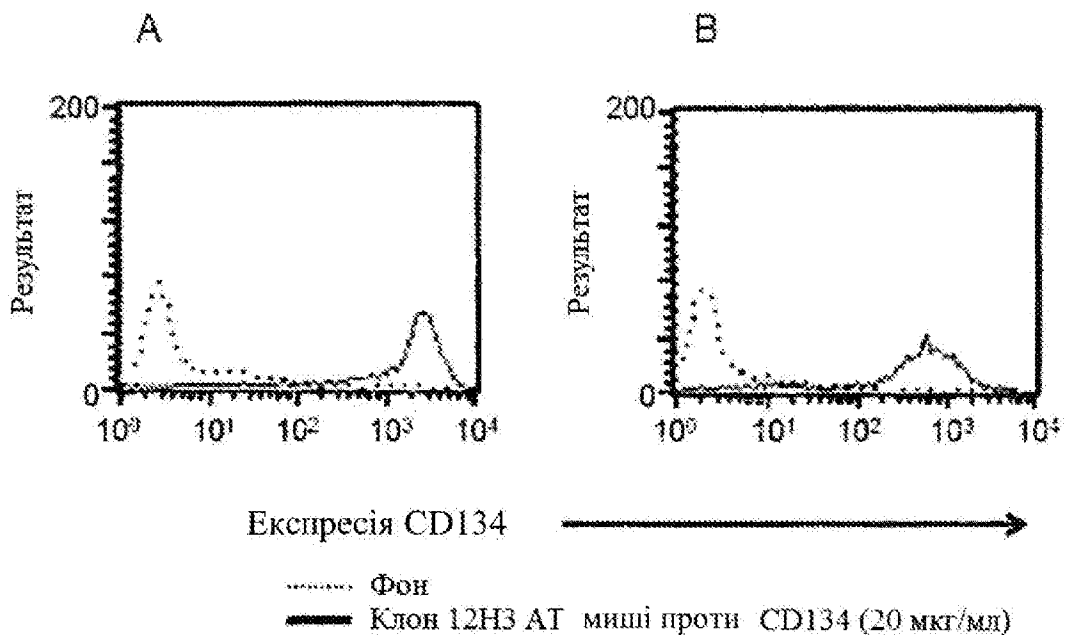
Фігура 29



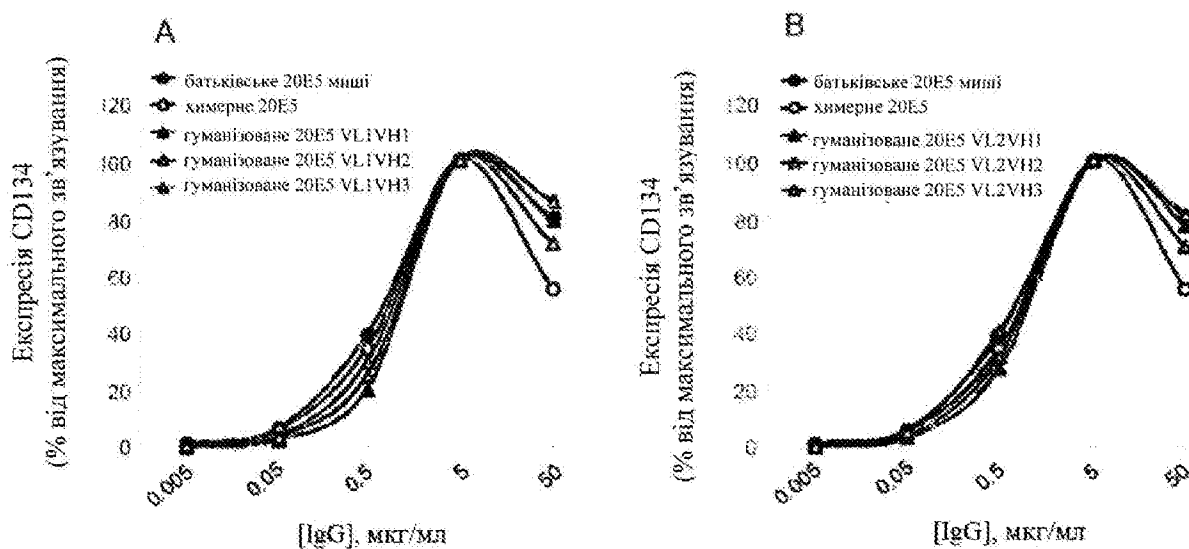
Фігура 30



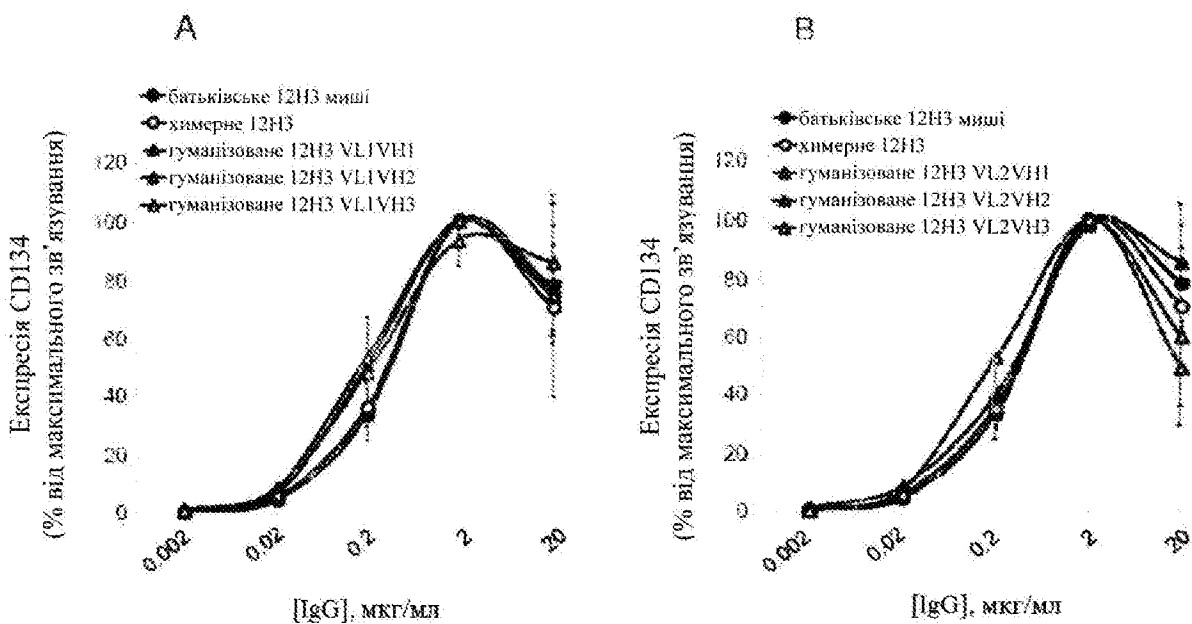
Фігура 31



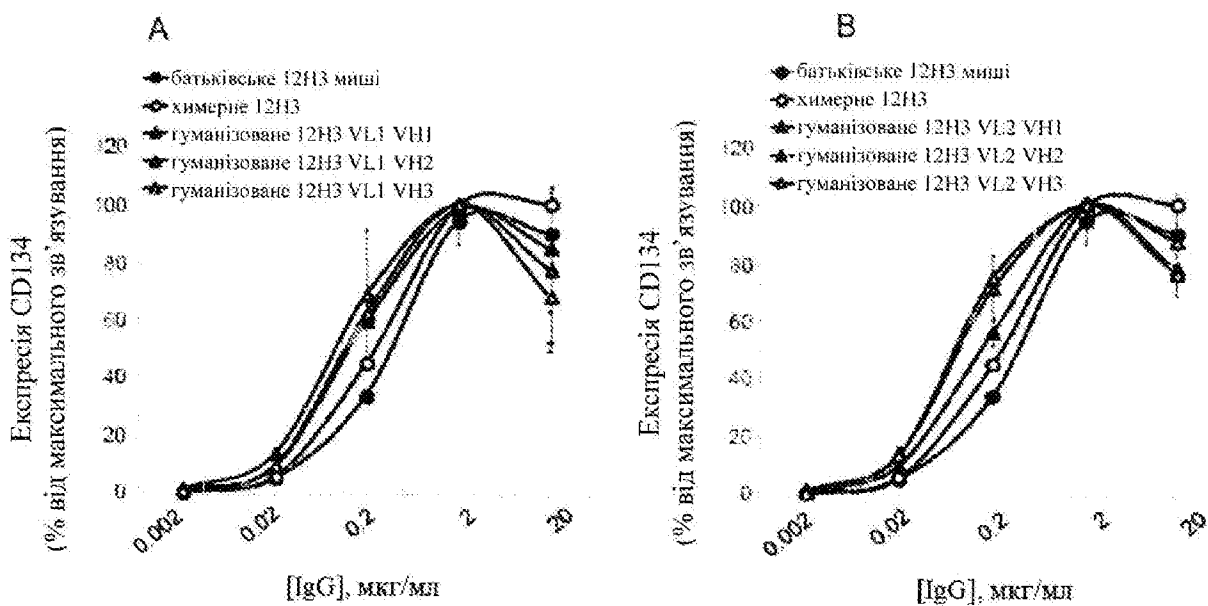
Фігура 32



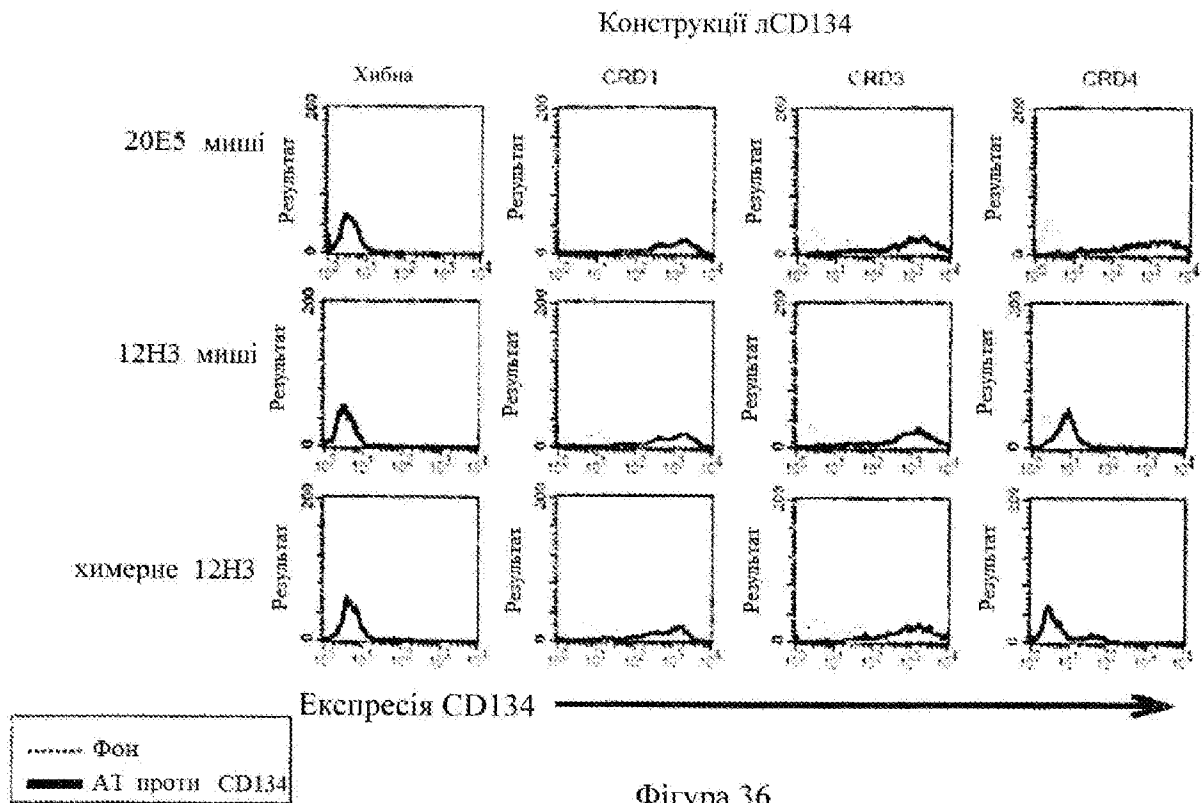
Фігура 33



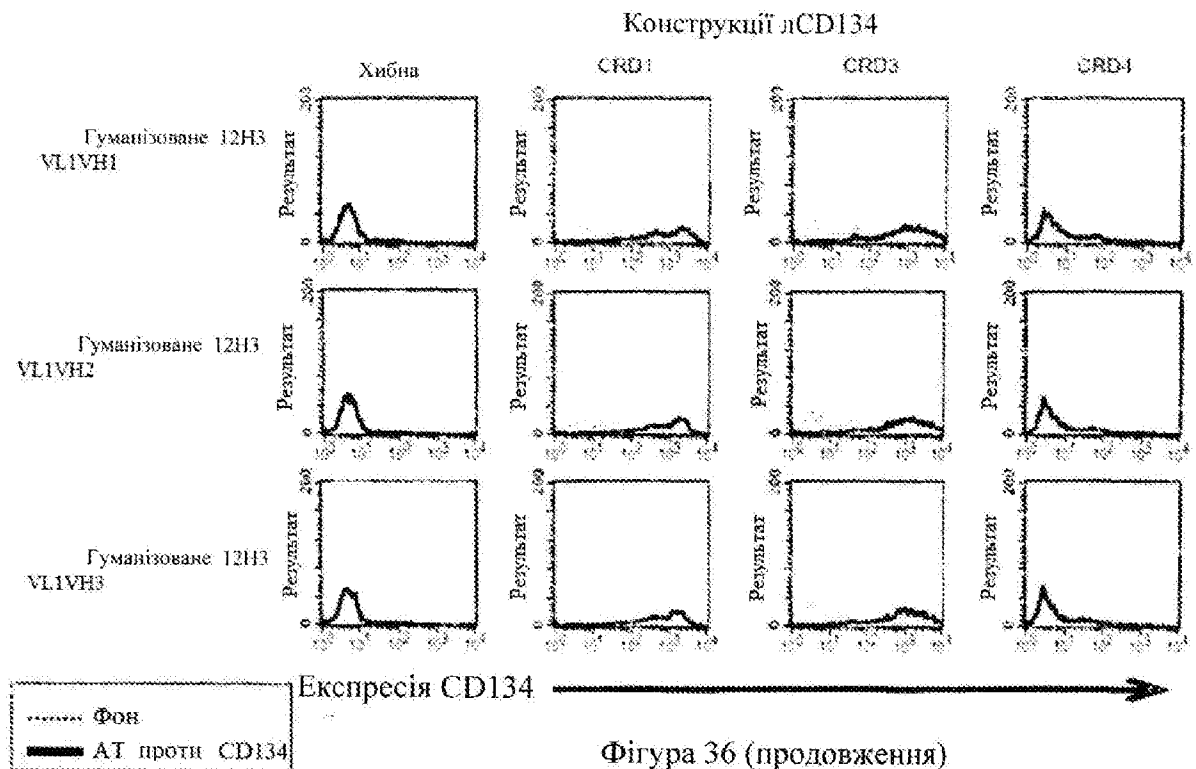
Фігура 34



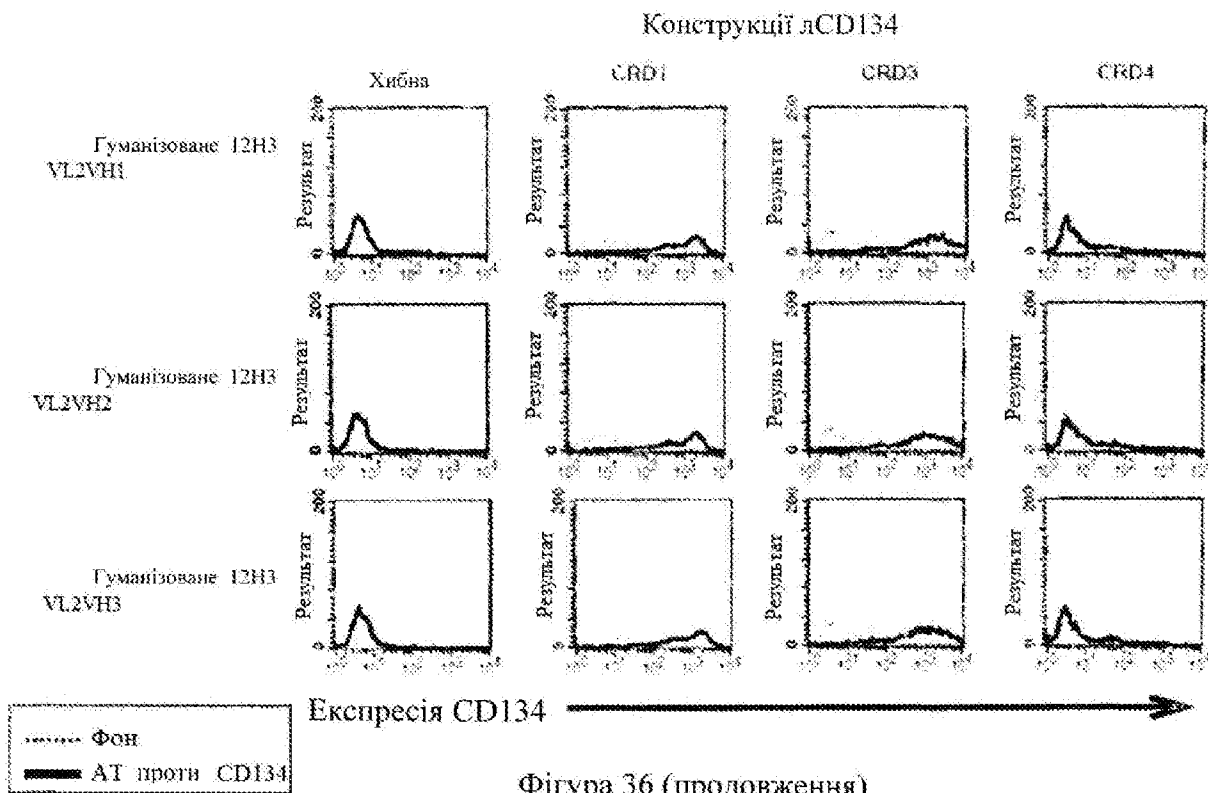
Фігура 35



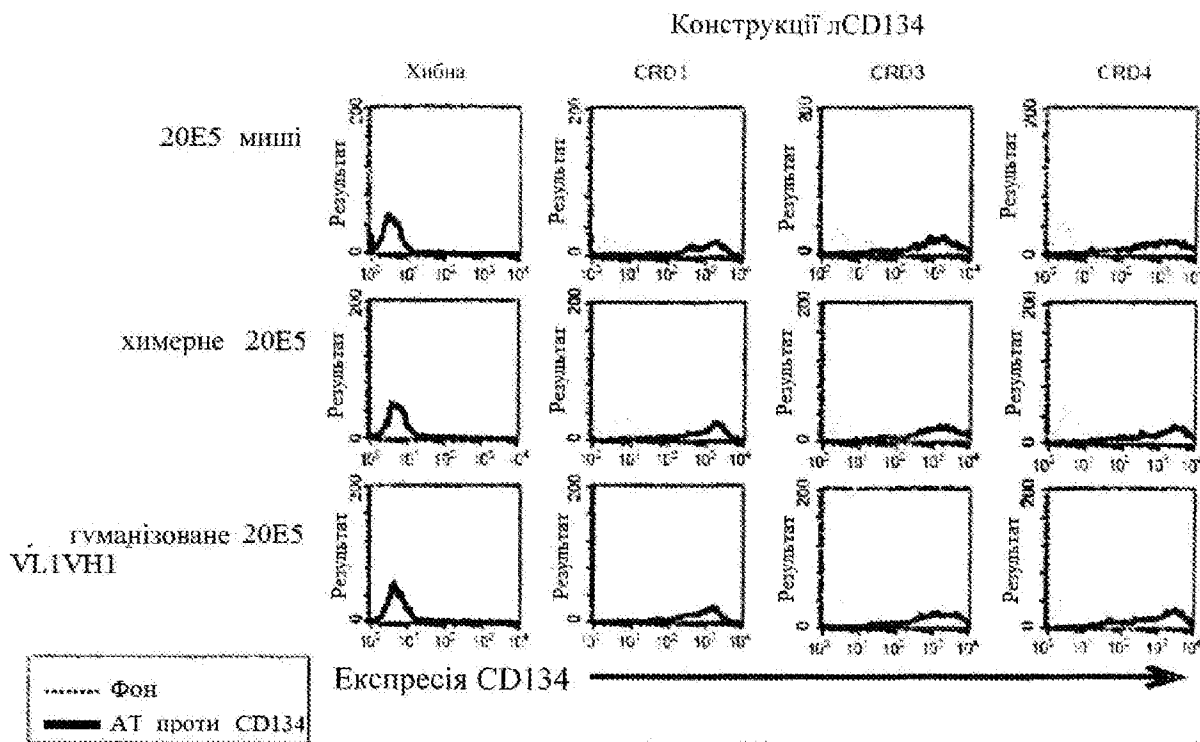
Фігура 36



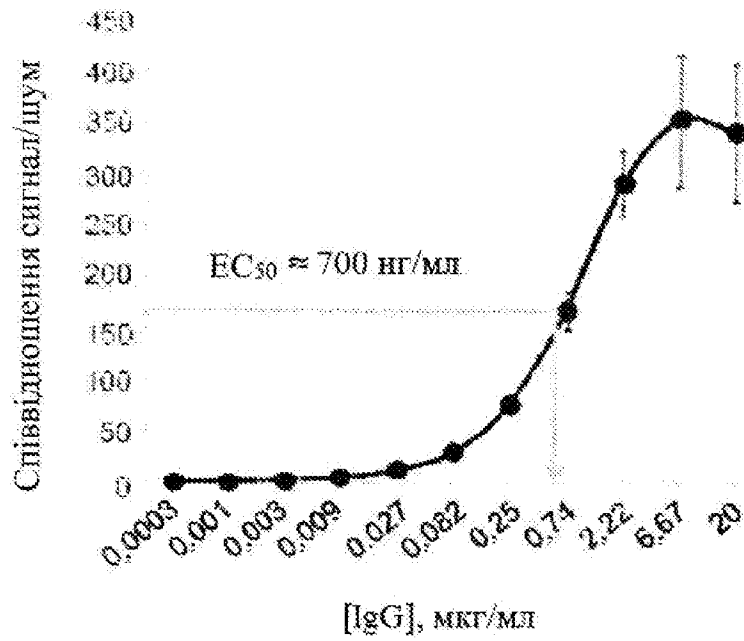
Фігура 36 (продовження)



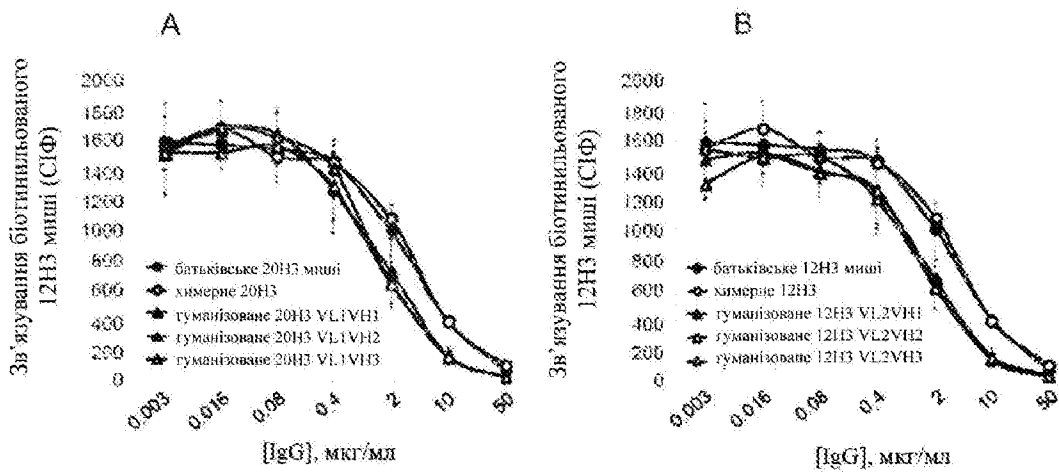
Фігура 36 (продовження)



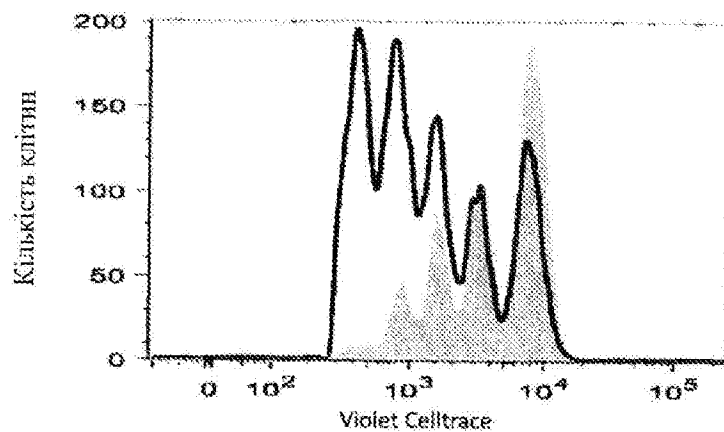
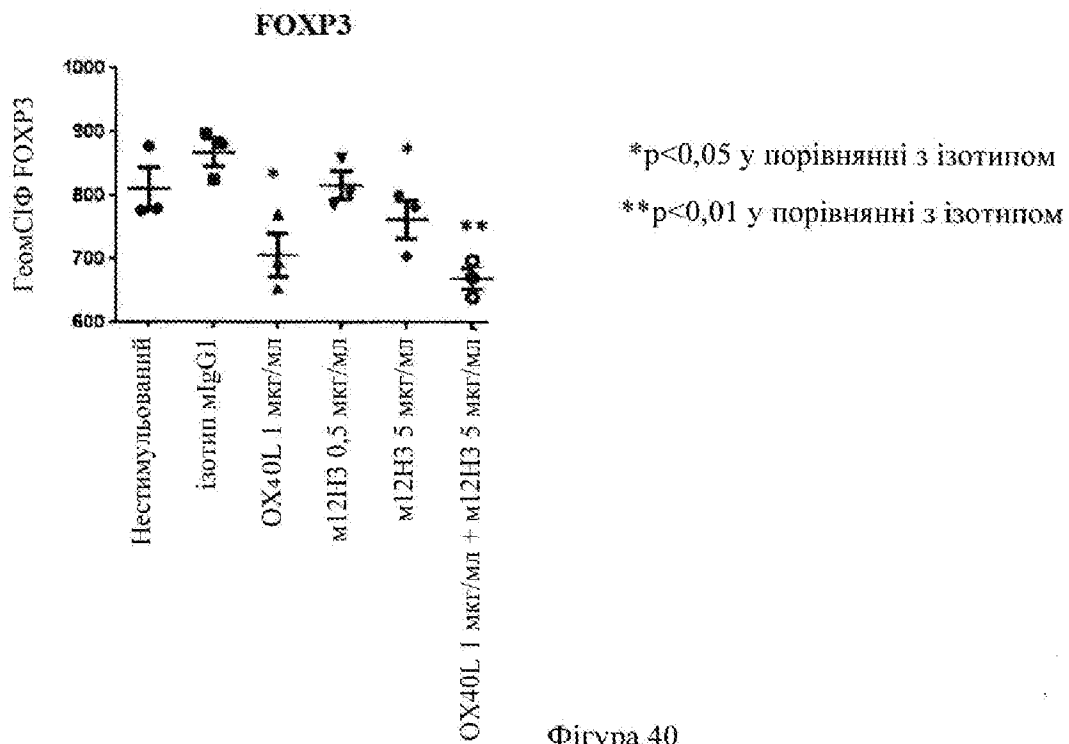
Фігура 37



Фігура 38



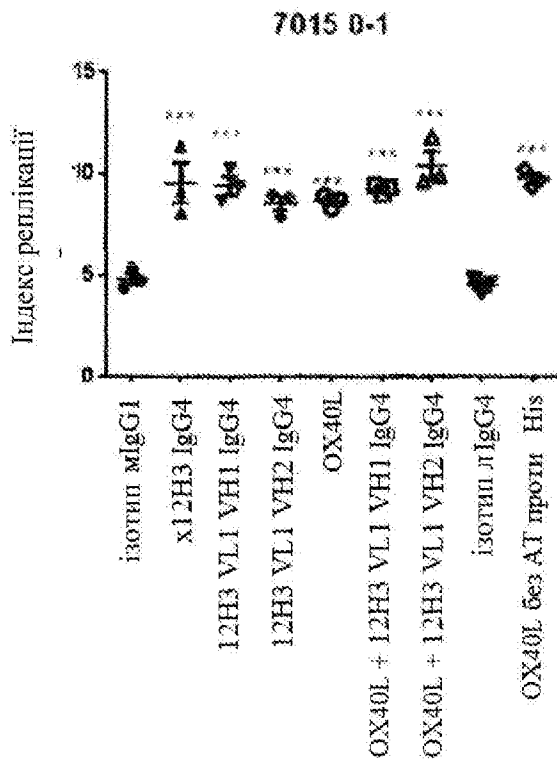
Фігура 39



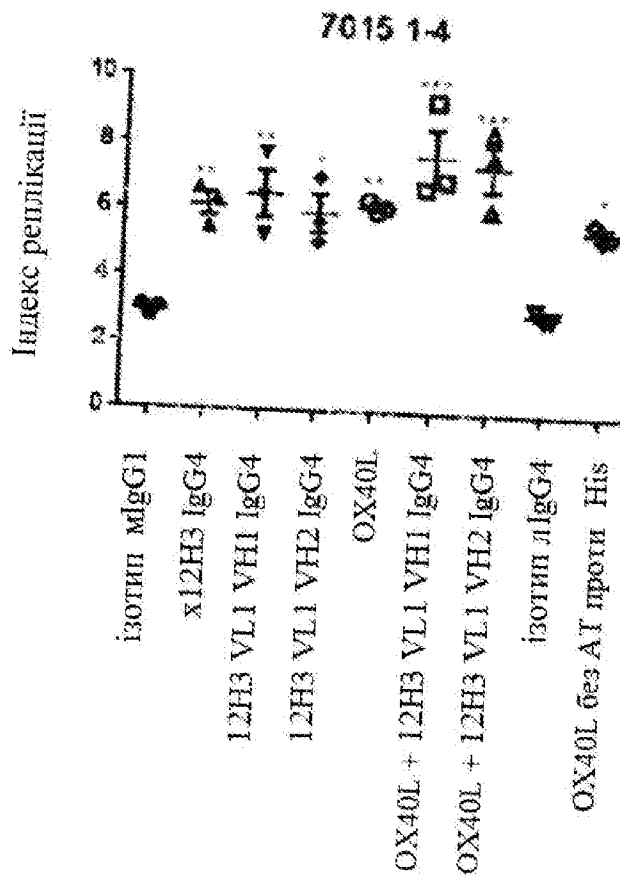
Зразки: співвідношення Treg/Teff 1:2

- Контроль ізотипу mIgG4 (приєднаний до планшета)
- 12НЗ VLI VH1 IgG4 (приєднаний до планшета)

Фігура 41



Фігура 42А



Фігура 42В

