



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **125208**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 13047	(72) Винахідник(и):	Бенатуїл Лоренцо (US), Арджириаді Марія А. (US), МакРай Бредфорд Л. (US), Хсієх Чунг-Мінг (US), Іган Девід А. (US), Харлан Джон І. (US), Джадж Расселл А. (US), Ван Жуй (US), Кінгсбурі Гілліан А. (US)
(22) Дата подання заявки:	27.05.2016	(73) Володілець (володільці):	ЕББВІ ІНК., 1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	03.02.2022	(74) Представник:	Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/168,425	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011123489 A2, 06.10.2011 US 2004120948 A1, 24.06.2004 WO 2007124299 A2, 01.11.2007
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	29.05.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.02.2018, Бюл.№ 4		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	02.02.2022, Бюл.№ 5		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2016/034716, 27.05.2016		

(54) АНТИТІЛО ДО CD40

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла до CD40. Також винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить антитіло до CD40, виділеної нуклеїнової кислоти, вектору, клітини-хазяїна, способу одержання антитіла до CD40.

UA 125208 C2

Споріднені заявки

Даний винахід заявляє пріоритет на підставі попередньої заявки на патент США № 62/168425, поданої 29 травня 2015 року, повний зміст якої цим включено в даний документ за допомогою посилання.

5 Перелік послідовностей

Дана заявка містить перелік послідовностей, який був наданий в електронному вигляді у форматі ASCII і цим включений за допомогою посилання у всій повноті. Вказана ASCII-копія, створена 12 травня 2016 року, називається 117813-10420_SL.txt і має розмір 91019 байт.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ ВІНАХОДУ

10 Даний винахід стосується антитіл до CD40 (CD40) та їхніх антиген-зв'язувальних частин, а також способів їх застосування у запобіганні різним захворюванням та/або лікуванні їх.

Передумови винаходу

CD40 є представником родини рецепторів фактора некрозу пухлини (TNF), який відіграє важливу роль у розвитку В-клітин, активації лімфоцитів і функціонуванні антиген-презентувальних клітин (APC). Експресія CD40 на епітелії, лейкоцитах і ендотелії судин підвищена під час органоспецифічних аутоімунних захворювань, а також системного аутоімунітету, як, наприклад, системного червоного вовчака (SLE). Порухення шляху передавання сигналу CD40L/CD40 знижує вироблення прозапальних цитокінів, таких як IL-23 і TNF, уповільнює диференціювання Т-хелперних клітин і послаблює їхню функцію, а також пригнічує активацію макрофагів у пацієнтів із хронічними запальними захворюваннями, такими як хвороба Крона. Взаємодія CD40 із CD40L індукуює як гуморальні, так і клітинні імунні відповіді. CD40 керує цією парою ліганд-рецептор з активацією В-клітин та інших антиген-презентувальних клітин (APC), у тому числі дендритних клітин (DC).

CD40 являє собою трансмембранний білок І типу розміром 48 кДа (van Kooten, J Leukoc Biol. 2000 Jan;67(1):2-17), який експресується на цілому ряді гемопоетичних (лімфоцитах, моноцитах, дендритних клітинах) та відмінних від гемопоетичних (епітелію, ендотелію, фібробластах) типах клітин. CD40L експресується переважно на активованих Т-клітинах, В-клітинах і тромбоцитах. Значна частина розуміння природи CD40/CD40L приходить у результаті вивчення взаємодії між APC (експресія CD40 або на дендритних клітинах (DC), або на В-клітинах) і Т-клітинами, що експресують CD40L. У разі В-клітин, що покояться, залучення CD40L запускає активацію, проліферацію В-клітин, а також розвиток В-клітин пам'яті (Kehry, Immunol. 1996 Apr 1;156(7):2345-8). Передавання сигналу за допомогою CD40 також потрібне для перемикавання класу імуноглобулінів і утворення гермінативного центру. Важливість шляху передавання сигналу CD40/CD40L для біології В-клітин чітко виражена у мишей із дефіцитом за CD40 або CD40L, у яких відсутні гермінативні центри, а Т-залежні гуморальні відповіді супресовані. Однак Т-незалежні відповіді з IgG у мишей CD40-/- залишаються незмінними, що дає змогу припустити, що у цих мишей відсутня взаємодія між клітинами. Миші з дефіцитом по CD40 також характеризуються дефіцитами щодо Т-клітинного компартмента. Передавання сигналу через CD40 на дендритних клітинах збільшує кількість молекул MHC класу II, а також різних коstimулювальних молекул, таких як CD80 і CD86, і стимулює дозрівання DC. Зріла DC стимулює активацію і виживання CD4+Т-клітин за допомогою вироблення цитокінів, таких як IL-2 і IL-12. Неефективне праймування Т-клітин, мабуть, є головною причиною порушених Т-залежних гуморальних відповідей у мишей CD40L-/- (Grewal, Nature. 1995 Dec 7;378(6557):617-20). Аналогічний фенотип В-клітин можна спостерігати у людей зі зчепленим із Х-хромосомою гіпер-IgM-синдромом. Такі пацієнти страждають від первинного імунодефіциту внаслідок мутацій у локусі CD40L, що унеможлиблює передавання сигналу CD40/CD40L. Ці індивідууми характеризуються підвищеними рівнями IgM і не можуть виробляти IgA, IgG і IgE, що призводить до підвищеного ризику опортуністичних інфекцій (Adriana, J Clin Immunol. 2008 May;28 Suppl 1:S62-6).

50 Шлях передавання сигналу за допомогою CD40 є центральним у переході лімфоцитів, що покояться, або інтактних лімфоцитів і APC в активований/зрілий фенотип. Хоча праймування Т-клітин і активація В-клітин можуть відбуватися за відсутності передавання сигналу CD40/CD40L, цей шлях потрібен для розвитку стійкої адаптивної імунної відповіді. Залучення CD40 під дією CD40L приводить до залучення факторів, асоційованих із TNF-рецептором (TRAF), до цитоплазматичного домену CD40 (Bishop, Adv Exp Med Biol. 2007;597:131-51). Фосфорилування різних білків TRAF приводить до активації як канонічного, так і неканонічного NFκB-шляхів. Крім того, асоціація JAK3 з цитоплазматичним хвостом CD40 приводить до активації STAT5, що індукуює дозрівання DC, а також вироблення TNF і IFNγ. TRAF6-залежна активація PI3K являє собою ключовий сигнал виживання DC, тоді як TRAF2/TRAF6 мають резервні функції під час активації NFκB і підвищувальної регуляції експресії CD80 (Hostager, J Biol Chem. 2003 Nov

14;278(46):45382-90). Було показано, що всі TRAF 2, 3, 5 і 6 відіграють важливу роль у перемиканні класу імуноглобулінів, опосередкованому передаванням сигналу за допомогою CD40 (Leo, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16; 96(4): 1421–1426).

Стало відомо, що шлях передавання сигналу CD40/CD40L залучений у патогенез багатьох аутоімунних захворювань, у тому числі таких, як системний червоний вовчак (SLE), запальне захворювання кишечника (IBD), розсіяний склероз, ревматоїдний артрит і синдром Шегрена (Law and Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009;647:8-36). Рівень експресії CD40 підвищується на макрофагах, ендотелії, епітелії і В-клітинах у тканинах, уражених хронічним аутоімунітетом, у тому числі в нирці, кишечнику і суглобах (Borchering, Am J Pathol. 2010 Apr;176(4):1816-27;; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000 Jun;95(6):1516-23). Рівень розчинного CD40L підвищений у пацієнтів, які страждають від SLE, IBD і синдрому Шегрена, що узгоджується із запальним навантаженням у даних пацієнтів.

Деякі з найбільш ранніх доказів залучення шляху CD40/CD40L у хронічні запалення кишечника взяті з доклінічних моделей, в яких mAb до CD40L захищали гризунів від експериментального коліту (de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23; Liu, J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6005-14; Stuber, J Exp Med 1996 Feb 1, 183(2):693-8). Зниження показників активності захворювання було пов'язане зі зниженим виробленням прозапальних цитокінів у травному каналі та захистом від хронічної втрати маси тіла. Аналогічні результати спостерігали у тварин, які мали генетичний дефіцит за CD40 або CD40L (de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23). Обробка мишей за допомогою mAb до CD40L після розвитку захворювання все ще була ефективною в зниженні активності захворювання, що дає змогу припустити, що даний шлях є критично важливим для підтримки хронічного запального захворювання. Крім того, антитіл-агоністів CD40 досить, щоб спричинити запалення кишечника у мишей, у яких були відсутні лімфоцити (Uhlig, Immunity. 2006 Aug;25(2):309-18). Пізніші дані, одержані із застосуванням siRNA CD40, також вказали на важливу роль передавання сигналу за допомогою CD40 під час коліту (Arranz, J Control Release 2013 Feb 10;165(3):163-72). Під час хвороби Крона в моноцитах власної пластинки й епітелії експресуються високі рівні CD40, і вміст моноцитів CD40+ в периферичній крові збільшений. До того ж було встановлено зв'язок між поліморфізмами в локусі гена CD40 і підвищеною сприйнятливістю до IBD. У пацієнтів із хворобою Крона, які одержували лікування за допомогою антитіл до TNF, транскрипційний аналіз показує, що рівні mRNA CD40 у пацієнтів знижені із задовільною відповіддю на медикаментозне лікування. Однак у пацієнтів зі слабкою відповіддю на інгібітори TNF рівні mRNA CD40 залишаються без зміни, що дає змогу припустити, що CD40-залежні, TNF-незалежні шляхи можуть стимулювати запалення у таких пацієнтів. Дослідження дають змогу припустити, що пригнічування передавання сигналу, опосередкованого CD40, є важливим під час патогенезу IBD, а також інших аутоімунних захворювань. Відповідно, залишається необхідність в антитілах-антагоністах до CD40 та їхніх антиген-зв'язувальних частинах, які можна застосовувати з терапевтичною метою для лікування хронічних запальних захворювань і порушень, таких як хвороба Крона.

Короткий опис винаходу

Даний винахід стосується антитіл-антагоністів до CD40 або їхніх антиген-зв'язувальних частин. Антитіла за даним винаходом включають без обмежень гуманізовані антитіла-антагоністи та їхні антиген-зв'язувальні частини, які здатні зв'язувати CD40 людини і практично не проявляють агоністичної активності.

У першому аспекті даного винаходу представлено виділене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент зв'язують епітоп CD40 людини, який визначається топографічними ділянками Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 і Thr24-Cys37 із SEQ ID NO:1. В одному варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина являють собою антитіло-антагоніст. В одному варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина являють собою антитіло-антагоніст, яке практично не проявляє агоністичної активності.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR3 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR3 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 12. У додатковому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 111, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 11. В іншому додатковому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 42, і

варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 11. В іншому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 6, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 21.

В одному варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина відносяться до ізо типу IgG. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина відносяться до ізо типу IgG1 або IgG4.

В одному варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина характеризуються IC₅₀, що становить щонайменше 50 нМ, в аналізі з геном-репортером на клітинах Jurkat.

В іншому аспекті винаходу представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12, та/або варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8. В одному варіанті здійснення варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12, і де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8. В іншому варіанті здійснення варіабельна ділянка важкого ланцюга з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини додатково містить CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 42. В іншому додатковому варіанті здійснення варіабельна ділянка легкого ланцюга з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини додатково містить CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11. В іншому варіанті здійснення варіабельна ділянка важкого ланцюга з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини додатково містить CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 6. В іншому додатковому варіанті здійснення варіабельна ділянка легкого ланцюга з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини додатково містить CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 21.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить набір CDR під SEQ ID NO: 6, 42 і 8, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить набір CDR під SEQ ID NO: 21, 11 і 12.

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина є гуманізованими. У додатковому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина додатково містять акцепторну каркасну ділянку людини. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення акцепторна каркасна ділянка людини містить амінокислотну послідовність, вибрану із SEQ ID NO: 82-106. В іншому варіанті здійснення акцепторна каркасна ділянка людини містить щонайменше одну амінокислотну заміну каркасної ділянки, де амінокислотна послідовність каркасної ділянки щонайменше на 65 % ідентична послідовності вказаної акцепторної каркасної ділянки людини і містить щонайменше 70 амінокислотних залишків, ідентичних указаним акцепторній каркасній ділянці людини. У додатковому варіанті здійснення акцепторна каркасна ділянка людини містить щонайменше одну амінокислотну заміну каркасної ділянки за ключовим залишком, причому вказаний ключовий залишок вибраний із:

- залишку, суміжного з CDR;
- залишку із сайтом глікозилювання;
- рідкісного залишку;
- залишку, здатного взаємодіяти з CD40 людини;
- залишку, здатного взаємодіяти з CDR;

канонічного залишку;

контактного залишку між варіабельною ділянкою важкого ланцюга та варіабельною ділянкою легкого ланцюга;

залишку в межах зони Vernier та

залишку в ділянці, яка перекривається між CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга, визначеною за Chothia, і першою каркасною ділянкою важкого ланцюга, визначеною за Kabat.

У додатковому пов'язаному варіанті здійснення ключовий залишок вибраний із 48H, 49H і 36L. В одному варіанті здійснення заміна ключового залишку відбувається у варіабельній ділянці важкого ланцюга і являє собою V48I або S49A. В іншому варіанті здійснення заміна ключового залишку відбувається у варіабельній ділянці легкого ланцюга і являє собою Y36F.

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна

частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 28. В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 20.

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина практично не проявляє агоністичної активності. В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина пригнічують зв'язування CD40 з лігандом CD40 (CD40L) або з розчинним лігандом CD40 (sCD40L). В іншому додатковому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина зв'язують CD40 макаки-крабоїда. В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина зв'язують CD40 людини і макаки-крабоїда, але не зв'язують CD40 щура, кролика або миші.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина здатні модулювати біологічну функцію CD40. У додатковому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина здатні нейтралізувати CD40. У ще одному додатковому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина пригнічують активацію NF-κB.

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина характеризуються константою асоціації (K_{on}) із CD40, вибраною зі щонайменше приблизно $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; щонайменше приблизно $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; щонайменше приблизно $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; щонайменше приблизно $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ і щонайменше приблизно $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; як виміряно за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина характеризуються константою дисоціації (K_D) із CD40, вибраною із групи, що складається з не більш ніж приблизно 10^{-7} M ; не більш ніж приблизно 10^{-8} M ; не більш ніж приблизно 10^{-9} M ; не більш ніж приблизно 10^{-10} M ; не більш ніж приблизно 10^{-11} M ; не більш ніж приблизно 10^{-12} M і не більш ніж 10^{-13} M .

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина містять константний домен важкого ланцюга імунoglobуліну з константного домену IgM людини, константного домену IgG1 людини, константного домену IgG2 людини, константного домену IgG3 людини, константного домену IgG4 людини, константного домену IgA людини або константного домену IgE людини. У пов'язаному варіанті здійснення константний домен ділянки важкого ланцюга імунoglobуліну з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини являє собою константний домен IgG1 людини. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення константний домен IgG1 людини з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:3.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина додатково містять константний домен легкого ланцюга імунoglobуліну, що містить константний домен каппа-ланцюга Ig людини або константний домен лямбда-ланцюга Ig людини. У пов'язаному варіанті здійснення константний домен каппа-ланцюга Ig людини з антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO:4, або де константний домен лямбда-ланцюга Ig людини містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO:81.

У певних варіантах здійснення даного винаходу також представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, яка конкурує з антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, викладеними в будь-яких аспектах і варіантах здійснення, описаних у даному документі.

В іншому аспекті даного винаходу представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, які містять CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:6, CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:42, CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:8, CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:21, CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:11, і CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:12.

В іншому аспекті даного винаходу представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що містять варіабельний домен важкого ланцюга, який містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 28, і варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 20. В іншому аспекті даного винаходу представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-

зв'язувальна частина, які містять варіабельний домен важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю із SEQ ID NO: 28, та/або варіабельний домен легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю із SEQ ID NO: 20.

В іншому аспекті даного винаходу представлено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що містять важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 41, або послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю із SEQ ID NO: 41, та/або легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 40, або послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичністю із SEQ ID NO: 40. В одному варіанті здійснення важкий ланцюг антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 41, а легкий ланцюг антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 40.

В іншому аспекті даного винаходу представлено антитіло до CD40, що містить важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 41, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 40.

В одному варіанті здійснення антитіла або їхні антиген-зв'язувальні частини за даним винаходом є рекомбінантними.

У певних варіантах здійснення даного винаходу також представлена фармацевтична композиція, що містить антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, викладені в будь-яких аспектах і варіантах здійснення, описаних у даному документі, і фармацевтично прийнятний носій.

В інших певних варіантах здійснення даного винаходу також представлена фармацевтична композиція, що містить антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, викладені в будь-яких аспектах і варіантах здійснення, описаних у даному документі, і полісорбат. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення полісорбат являє собою полісорбат 80.

В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить гістидиновий буфер.

В іншому додатковому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить поліол. У пов'язаному варіанті здійснення поліол вибраний із маніту, сорбіту, трегалози або сахарози.

В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція характеризується рН, що становить від приблизно 4 до приблизно 8. У пов'язаному варіанті здійснення фармацевтична композиція характеризується рН, що становить від приблизно 5 до приблизно 7.

В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція є ліофілізованою.

В інших варіантах здійснення даного винаходу також представлена виділена нуклеїнова кислота, що кодує амінокислотну послідовність антитіла-антагоніста до CD40 за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі. У додатковому варіанті здійснення даного винаходу представлений вектор, що містить виділену нуклеїнову кислоту. У пов'язаному варіанті здійснення вектор вибраний із векторів pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV і pBJ.

В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн містить вектор. У пов'язаному варіанті здійснення клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною або еукаріотичною клітиною. У додатковому варіанті здійснення еукаріотична клітина являє собою клітину представника найпростіших, тваринну клітину, рослинну клітину, грибку клітину, клітину дріжджів, клітину ссавця, клітину птаха або клітину комах. В іншому додатковому варіанті здійснення клітина ссавця являє собою клітину CHO або клітину COS.

У певних здійснення даного винаходу також представлений спосіб одержання антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини, причому спосіб передбачає стадії культивування клітини-хазяїна за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі, у середовищі для культивування в умовах, придатних для вироблення антитіла-антагоніста до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини. У додаткових варіантах здійснення за допомогою способу одержані антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина.

В інших варіантах здійснення даного винаходу також представлений спосіб зниження активності CD40 людини, причому спосіб передбачає стадії приведення CD40 людини в контакт з антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі, унаслідок чого активність CD40 людини знижується. У додатковому варіанті здійснення спосіб являє собою *in vitro* спосіб.

В інших певних варіантах здійснення даного винаходу також представлений спосіб

лікування суб'єкта-людини з порушенням, за якого CD40 чинить негативний вплив, який передбачає введення суб'єкту ефективної кількості антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі.

В інших варіантах здійснення даного винаходу також представлений спосіб зниження активності CD40 людини у суб'єкта-людини з порушенням, за якого активність CD40 чинить негативний вплив, причому спосіб передбачає стадію введення суб'єкту-людині антитіла або його антиген-зв'язувальної частини за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі, унаслідок чого активність CD40 людини у суб'єкта-людини знижується.

У додатковому варіанті здійснення антитіла або його антиген-зв'язувальну частину вводять до введення суб'єкту другого засобу, одночасно з цим або після цього. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення другий засіб вибраний з антитіла або його фрагмента, здатних зв'язувати IL-12 людини; PGE2; LPA; NGF; CGRP; SubP; RAGE; гістаміну; блокатора гістамінових рецепторів; брадикініну; IL-1 альфа; IL-1-бета; VEGF; PLGF; метотрексату; кортикостероїду, модулятора глюкокортикоїдних рецепторів; циклоспорину, рапаміцину, FK506, нестероїдного протизапального засобу, інгальційного стероїду; бета-агоніста; бета-агоніста короткої дії або тривалої дії; антагоніста лейкотрієнів або лейкотрієнових рецепторів; ADVAIR; інгібітора IgE; антитіл до IgE; XOLAIR; інгібітора фосфодіестерази; інгібітора PDE4; ксантину; антихолінергічного лікарського засобу; засобу, що стабілізує мастоцити; кромоліну; інгібітора IL-4; інгібітора IL-5; інгібіторів еотаксину/CCR3, антагоністів гістаміну або його рецепторів, у тому числі H1, H2, H3 і H4; антагоністів простагландину D або його рецепторів DP1 і CRTH2; антагоніста TNF; розчинного фрагмента рецептора TNF; ENBREL; антагоніста TNF-ферменту; інгібітора TNF-перетворювального ферменту (TACE); антагоніста мускаринових рецепторів; антагоніста TGF-бета; інтерферону-гамма; перфенідону; хіміотерапевтичного засобу, метотрексату; лефлуноміду; сиролімусу (рапаміцину) або його аналога, CCI-779; COX2 або інгібітора cPLA2; NSAID; імуномодулятора; інгібітора p38; TPL-2, MK-2 і інгібітора NFkB; буденосиду; епідермального фактора росту; кортикостероїду; циклоспорину; сульфасалазину; аміносаліцилату; 6-меркаптопурину; азатіоприну; метронідазолу; інгібітора ліпоксигенази; месаламіну; олсалазину; балсалазиду; антиоксиданту; інгібітора тромбоксану; антагоніста рецептора IL-1; антитіла до IL-1 β ; антитіла до IL-6; фактора росту; інгібітора еластази; піридиніл-імідазольної сполуки; антитіла або агоніста до LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF або PDGF; антитіла до CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їхнього ліганду; FK506; рапаміцину; мікофенолату мофетилу; ібупрофену; преднізолону; інгібітора фосфодіестерази; агоніста аденозинового рецептора; антитромбінного засобу; інгібітора комплекменту; адренергічного засобу; інгібітора IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP-кінази; інгібітора IL-1 β -перетворювального ферменту; інгібітора TNF- α -перетворювального ферменту; інгібітора передавання сигналу в Т-клітинах; інгібітора металопротеїнази; 6-меркаптопурину; інгібітора ангіотензин-перетворювального ферменту; розчинного цитокинового рецептора; розчинного p55-TNF-рецептора; розчинного p75-TNF-рецептора; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; протизапального цитокину; IL-4; IL-10; IL-11 або TGF- β .

У додатковому варіанті здійснення порушення вибране із порушення з боку дихальної системи; астми; алергічної і неалергічної астми; астми внаслідок інфікування; астми внаслідок інфікування респіраторно-синцитіальним вірусом (RSV); хронічного обструктивного захворювання легень (COPD); патологічного стану із залученням запалення дихальних шляхів; еозинофілії; фіброзу і надлишкового вироблення слизу; муковісцидозу; пневмофіброзу; atopічного порушення; atopічного дерматиту; кропив'янки; екземи; алергічного риніту; алергічного гастроентериту; запального та/або аутоімунного патологічного стану шкіри; запального та/або аутоімунного патологічного стану органів шлунково-кишкового тракту; запальних захворювань кишечника (IBD); виразкового коліту; хвороби Крона; запального та/або аутоімунного патологічного стану печінки; цирозу печінки; фіброзу печінки; фіброзу печінки, спричиненого вірусом гепатиту В та/або С; склеродермії; пухлин або типів раку; гепатоцелюлярної карциноми; гліобластоми; лімфоми; лімфоми Ходжкіна; вірусної інфекції; бактеріальної інфекції; паразитарної інфекції; інфікування HTLV-1; супресії прояву захисних імунних відповідей 1 типу і супресії прояву захисної імунної відповіді 1 типу під час вакцинації.

В іншому додатковому варіанті здійснення порушення вибране з аутоімунного або запального захворювання, такого як системний червоний вовчак (SLE), дискоїдний вовчак, люпус-нефрит, саркоїдоз, запальний артрит, у тому числі без обмежень ювенільний артрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, синдром Рейтера, анкілозуювальний спондилоартрит

і подагричний артрит, відторгнення трансплантата органа або тканини, надгостре, гостре або хронічне відторгнення та/або реакція "трансплантат проти хазяїна", розсіяний склероз, гіпер-IgE-синдром, вузликовий поліартеріїт, первинний біліарний цироз печінки, запальне захворювання кишечника, хвороба Крона, целіакія (глутензалежна ентеропатія), аутоімунний гепатит, перніціозна анемія, аутоімунна гемолітична анемія, псоріаз, склеродермія, важка міастенія, аутоімунна тромбоцитопенічна пурпура, аутоімунний тиреоїдит, хвороба Грейвса, тиреоїдит Хашимото, хвороба імунних комплексів, синдром хронічної втоми та імунної дисфункції (CFIDS), поліміозит і дерматоміозит, криоглобулінемія, тромболізис, кардіоміопатія, звичайна пухирчатка, інтерстиціальний фіброз легень, саркоїдоз, цукровий діабет I типу і II типу, гіперчутливість 1, 2, 3 і 4 уповільненого типу, алергія або алергічні порушення, небажані/непередбачені імунні відповіді на терапевтичні білки, астма, синдром Черджа-Строса (алергічний грануломатоз), атопічний дерматит, алергічний і простий контактний дерматит, кропив'янка, IgE-опосередкована алергія, атеросклероз, васкуліт, ідіопатичні запальні міопатії, гемолітична хвороба, хвороба Альцгеймера, хронічна запальна демієлінізуюча полінейропатія, синдром Шегрена і псоріаз.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування запального захворювання кишечника (IBD).

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування виразкового коліту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування хвороби Крона.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування системного червоного вовчака (SLE).

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування саркоїдозу.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування ювенільного артрити.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування ревматоїдного артрити.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування псоріатичного артрити.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування анкілозуючого спондилоартрити.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування гнійного гідраденіту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування увеїту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування синдрому Шегрена.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування псоріазу.

В іншому додатковому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент вводять за допомогою щонайменше одного шляху, вибраного з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, інтрацеліального, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, внутрішньоміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, внутрішньоочеревинного, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, внутрішньоректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального.

В інших певних варіантах здійснення даного винаходу також представлений спосіб визначення наявності CD40 або його фрагмента в тестованому зразку за допомогою імунологічного аналізу, де імунологічний аналіз передбачає приведення тестованого зразка в

контакт щонайменше з одним антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною за будь-яким з аспектів і варіантів здійснення, описаних у даному документі, і щонайменше з однією детективною міткою. У додатковому варіанті здійснення спосіб додатково передбачає стадії: (i) приведення тестованого зразка в контакт щонайменше з одним антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, де антитіло або його антиген-зв'язувальна частина зв'язуються з епітопом на CD40 або його фрагменті, так що утворюється перший комплекс; (ii) приведення комплексу в контакт щонайменше з однією детективною міткою, де детектовна мітка зв'язується з епітопом на першому комплексі або на CD40 або його фрагменті, який не зв'язаний антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, з утворенням другого комплексу; і (iii) виявлення наявності CD40 або його фрагмента в тестованому зразку на підставі сигналу, що генерується детективною міткою в другому комплексі, де наявність CD40 або його фрагмента прямо корелює із сигналом, що генерується детективною міткою. У додатковому пов'язаному варіанті здійснення спосіб додатково передбачає стадії: (i) приведення тестованого зразка в контакт щонайменше з одним антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, де антитіло або його антиген-зв'язувальна частина зв'язуються з епітопом на CD40 або його фрагменті, так що утворюється перший комплекс; (ii) приведення комплексу в контакт щонайменше з однією детективною міткою, де детектовна мітка конкурує з CD40 або його фрагментом за зв'язування з антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, так що утворюється другий комплекс; і (iii) виявлення наявності CD40 або його фрагмента в тестованому зразку на підставі сигналу, що генерується детективною міткою в другому комплексі, де наявність CD40 або його фрагмента опосередковано корелює із сигналом, що генерується детективною міткою.

В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачений DVD-Ig, який містить зв'язувальні ділянки, наприклад CDR, описані у даному документі. В одному варіанті здійснення DVD-Ig за даним винаходом містить чотири поліпептидних ланцюги, де два поліпептидних ланцюги містять VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, де VD1 являє собою перший варіабельний домен важкого ланцюга, VD2 являє собою другий варіабельний домен важкого ланцюга, C являє собою константний домен важкого ланцюга, X1 являє собою лінкер, за умови, що він не є CH1, а X2 являє собою Fc-ділянку; і два поліпептидних ланцюги містять VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, де VD1 являє собою перший варіабельний домен легкого ланцюга, VD2 являє собою другий варіабельний домен легкого ланцюга, C являє собою константний домен легкого ланцюга, X1 являє собою лінкер, за умови, що він не є CH1, а X2 не містить Fc-ділянку; і n дорівнює 0 або 1; де вказані чотири поліпептидних ланцюги вказаного зв'язувального білка утворюють чотири функціональних антиген-зв'язувальних сайти. В одному варіанті здійснення перший (та/або другий) важкий ланцюг DVD містить набір CDR, викладений під SEQ ID NO: 6, 42 і 8. В одному варіанті здійснення перша (та/або друга) варіабельна ділянка легкого ланцюга містить набір CDR, викладений під SEQ ID NO: 21, 11 і 12. В одному варіанті здійснення DVD-Ig за даним винаходом є моноспецифічним і зв'язує huCD40. В іншому варіанті здійснення DVD-Ig за даним винаходом є мультиспецифічним і зв'язує CD40 і другу молекулу-мішень.

Короткий опис графічних матеріалів

На фігурі 1A графічно зображена антагоністична активність химерного антитіла (антитіло 1 (Ab1)) порівняно з контрольним агоністом і відомими антитілами-антагоністами (4D11 (Astellas) і Bib (Boehringer)). На фігурі 1B графічно зображена активність того ж химерного антитіла Ab1 в аналізі на агоністичну активність із застосуванням тих же контрольних агоністів і антагоністів, що і на фігурі 1A.

На фігурі 2 графічно зображена агоністична активність (фігура 2A) і антагоністична активність (фігура 2B) гуманізованого антитіла Ab101 порівняно з антитілом 4D11, антитілом Blb, IgG-антитілом (контроль) і контрольним антитілом-агоністом (2141).

На фігурі 3 графічно зображені результати з *in vivo* досліджень гуманізованого антитіла Ab101. На фігурі 3A графічно зображене вироблення IgG у *hucid*-мишей, які одержували PBMC людини в комбінації з Ig-контролем, злиттям CTLA4-Ig або антитілом Ab101. На фігурі 3B графічно зображено виживання В-клітин у тієї же мишачої моделі, якій вводили ті ж засоби, що і на фігурі 3A.

На фігурі 4 показане вирівнювання амінокислотних послідовностей антитіл-антагоністів мишачих до CD40 людини і вирівнювання консенсусних послідовностей. На фігурі 4A показане вирівнювання послідовностей варіабельної ділянки легких ланцюгів антитіла 3 (Ab3) (SEQ ID NO:48), Ab1 (SEQ ID NO:9) і антитіла 2 (Ab2) (SEQ ID NO:76) і консенсусна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга (SEQ ID NO: 116). На фігурі 4B показане вирівнювання послідовностей варіабельної ділянки важких ланцюгів Ab3 (SEQ ID NO:44), Ab1 (SEQ ID NO:5) і Ab2 (SEQ ID NO:75) і консенсусна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга (SEQ ID NO: 117).

На фігурах 5A і 5B графічно зображена типова ефективність нейтралізації (антагоністична активність) (фігура 5A) і агоністична активність (фігура 5B) Ab102 щодо CD40 людини в аналізі активації моноцитів, описаному в прикладі 7. Активация моноцитів відповідала підвищенню концентрації TNF в кожному аналізі.

На фігурі 6 графічно зображене дозозалежне зниження бала на підставі ендоскопії в разі профілактичного введення антитіла 138 (Ab138). Антитіло 138 тестували за доз, що становлять 15, 5, 1,5 і 0,5 мг/кг. Застосовували IgG негативного контролю. Лікарський препарат проти р40IL-12/23 застосовували як позитивний контроль. Захворювання опосередковують клітини CD45Rbhi, які переносили у тварин. RBlow означає групу негативного контролю. Клітини CD45RBlow не опосередковують захворювання.

На фігурі 7 графічно зображені результати імуногістохімічного аналізу для визначення IBA1+ макрофагів у товстій кишці під час введення антитіла 138 (Ab138). Гістологічний аналіз зрізів товстої кишки показав зниження числа макрофагів (загальна міра запалення). Застосовували IgG негативного контролю. Лікарський препарат проти р40IL-12/23 застосовували як позитивний контроль.

На фігурі 8 графічно зображені рівні в сироватці крові антитіла 138 (Ab138), що циркулює, через 96 годин (дорівнюють C_{trough}) після введення кінцевої дози в моделі коліту, одержаної шляхом перенесення Т-клітин. Було показано, що рівні в сироватці крові є дозозалежними. Лікарський препарат проти р40IL-12/23 застосовували як позитивний контроль. Тільки 1 тварина в групі з дозою 0,5 мг/кг мала вимірювані рівні Ab138.

На фігурі 9A графічно зображені результати ендоскопії після введення антитіла 138 на мишачій моделі коліту. Лікування за допомогою антитіла 138 (Ab138) починали через три тижні після ін'єкції клітин, після ендоскопічного підтвердження захворювання, і було відзначено дозозалежне зниження сумарного бала MEDAI. Найвища доза (15 мг/кг) досягала статистичної значущості (фігура 9A).

На фігурі 9B графічно зображені гістологічні результати після введення антитіла 138. Гістологічний аналіз IBA1+ макрофагів у товстій кишці як міра мієлоїдного запалення показаний на фігурі 9B.

На фігурі 10 графічно зображені результати, які показують, що Ab102 пригнічувало IgM до KLN і IgG до KLN (пунктирна лінія) порівняно з контрольними тваринами, які одержували лікування тільки за допомогою середовища (суцільні лінії). Макакам-крабодіам (дві тварини/стать/група) вводили Ab102 за доз, що становлять 0 (тільки середовище) або 10 мг/кг підшкірно (SC), протягом 5 тижнів. Гемоціанін фісурели (KLN) вводили всім тваринам у день 8. Зразки сироватки крові збирали від кожної тварини в дні -11, -7, 0, 4, 7, 10, 14 і 21 відносно введення KLN (дні KLN).

Фігура 11A являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало протеїнурії у мишей MRL/lpr. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища у вигляді фосфатно-сольового буфера (PBS) застосовували як контроль. Стан протеїнурії визначали як процент мишей зі вмістом білка в сечі <300 мг/дл.

Фігура 11B являє собою графік, на якому зображені результати, які показують, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 продовжує виживання мишей MRL/lpr. Тваринам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища застосовували як контроль. Відсоток тварин, які вижили, показаний із плином часу.

Фігура 12A являє собою графік, на якому зображені результати, які показують, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало розвитку нефриту. На фігурі 12A показаний ефект антитіла 138 щодо гломерулонефриту у мишей, яким вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень, у день 29 і день 63. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Гломерулонефрит оцінювали за шкалою 0-4. Оскільки важкість гломерулонефриту посилювалася у мишей MRL з віком, лікування за допомогою антитіла 138 зберігало ефективність у зведенні до мінімуму гломерулонефриту за доз 5 і 15 мг/кг. Периваскулярне запалення оцінювали в балах за шкалою 0-4 на підставі наступних критеріїв: 0 – аж до невеликого числа рідкісних лімфоцитів; 1 – невелике число лімфоцитів, що утворюють пухкі агрегати; 2 – лімфоцити, що утворюють дискретні невеликі агрегати; 3 – поляризовані агрегати з лімфоцитів, які випинаються у просвіт прилеглої вени, але не можуть повністю оточити дугову артерію; 4 – агрегати лімфоцитів повністю оточують і поширюються в адвентиційну оболонку дугової артерії.

Фігура 12В являє собою графік, на якому зображені результати, які показують, що лікування за допомогою антитіла до CD40 запобігало розвитку нефриту. На фігурі 12В зображені результати, які показують ефект антитіла 138 щодо периваскулярного (PV) запалення в нирках у мишей, яким вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень, у день 29 і день 63. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Антитіло до CD40 із розрахунку 5 і 15 мг/кг було ефективним у зменшенні периваскулярних (PV) інфільтратів у нирках у дні 29 і 63.

Фігура 12С являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало розвитку нефриту. На фігурі 12С показаний ефект антитіла 138 щодо тубулоінтерстиційного запалення (TI) у мишей, яким вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень, у день 29 і день 60. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. TI зменшувалися на ранньому етапі захворювання.

Фігура 13А являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало запаленню слинних залоз. На фігурі 13А показаний ефект антитіла 138 щодо запалення слинних залоз у мишей, яким вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень, у день 29 і день 60. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Перидуктулярне запалення оцінювали в балах за шкалою 0-4 на підставі наступних критеріїв: 0 – аж до невеликого числа рідкісних лейкоцитів; 1 – невелике число лейкоцитів, що утворюють пухкі агрегати; 2 – лейкоцити, що утворюють дискретні невеликі агрегати; 3 – поляризовані агрегати з лейкоцитів, які повністю оточують протоку; 4 – агрегати лейкоцитів, які поширюються в залозисту паренхіму слинної залози.

Фігура 13В являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігає запаленню суглобів. На фігурі 13В показаний ефект антитіла 138 щодо запалення суглобів у мишей, яким вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень, у день 29 і день 60. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Запалення суглобів оцінювали в балах для кожної з двох лап миші за шкалою 0-4 на підставі наступних критеріїв: 0 – відсутність запалення; 1 – невелике число лейкоцитів у суглобовій щілині; 2 – лейкоцити, що часто зустрічаються в межах суглобової щілини зі слабкою синовіальною проліферацією; 3 – збільшена кількість лейкоцитів у суглобових щілинах із помірною синовіальною проліферацією; 4 – лейкоцити і синовіальна проліферація поширюються і об'єднуються в усіх суглобових щілинах з ерозією кістки та/або проліферацією, що явно розрізняються. Бали підсумовували, при цьому загальний можливий бал для миші становив 8.

Фігура 14 являє собою панель із чотирьох графіків (i-iv), на яких показано, що антитіло 138 до CD40 запобігало поширенню фолікулярних Т-хелперних клітин (Tfh) і В-клітин гермінативного центру (GC) в селезінку, як визначено за допомогою проточної цитометрії. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. На панелі (i) показано кількість Tfh-клітин у селезінці у день 29. На панелі (ii) показано кількість Tfh-клітин у селезінці у день 63. На панелі (iii) показано кількість В-клітин GC в селезінці у день 29. На панелі (iv) показано кількість В-клітин GC у селезінці у день 63.

Фігура 15А являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало підвищенню рівнів загальних IgG у день 29, що циркулюють. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень та 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль.

Фігура 15В являє собою графік, на якому показано, що лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 запобігало підвищенню рівнів загальних IgG, що циркулюють, у день 63. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень та 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль.

Фігура 16А являє собою графік, на якому показаний ефект лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 щодо титрів антитіла до двониткової ДНК (антитіло до dsDNA) у день 29. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на

тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Визначали титри антитіла до dsDNA у день 29.

5 Фігура 16B являє собою графік, на якому показано лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 щодо титрів антитіла до двониткової ДНК (антитіло до dsDNA) у день 63. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Визначали титри антитіла до dsDNA у день 63.

10 Фігура 17A являє собою графік, на якому показано, що профілактичне введення доз антитіла 138 до CD40 запобігало протеїнурії. Профілактичне лікування починали у мишей віком 26 тижнів, і мишей із протеїнурією виключали з дослідження. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Стан протеїнурії визначали як процент мишей зі вмістом білка в сечі <300 мг/дл.

15 Фігура 17B являє собою графік, на якому показано, що профілактичне введення доз антитіла 138 до CD40 продовжувало виживання під час застосування мишачої моделі SLE. Профілактичне лікування починали у мишей віком 26 тижнів, і мишей з протеїнурією виключали з дослідження. Мишам вводили дози, що становлять 15 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг антитіла 2 рази на тиждень або 15 мг/кг антитіла 1 раз на тиждень. Введення тільки середовища PBS застосовували як контроль. Процент виживання оцінювали до віку 36 тижнів.

20 Фігура 18A являє собою графік, на якому показано, що у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 у дозі, що становить 15 мг/кг IP 2 рази на тиждень, з часом розвивалася слабка протеїнурія, як показано за допомогою рівня білка в сечі (еквівалентно мг/дл). Середовище PBS, яке вводили IP 2 рази на тиждень, застосовували як контроль. 25 Преднізолон вводили в дозі, що становить 10 мг/кг, перорально (PO) один раз на день (SID). Ні у контрольних мишей, яких не лікували та яким вводили середовище PBS, ні у мишей, які одержували лікування за допомогою преднізолону, не розвивалася слабка протеїнурія. Граничне значення для протеїнурії вказано як 300 мг/дл.

30 Фігура 18B являє собою графік, на якому показана швидкість нормалізації протеїнурії у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 у дозі, що становить 15 мг/кг IP 2 рази на тиждень. З урахуванням швидкості нормалізації протеїнурії, як визначено за процентом мишей із нормальним умістом білка в сечі, середній час нормалізації протеїнурії становив 23 ± 7 днів. Середовище PBS, яке вводили IP 2 рази на тиждень, застосовували як контроль. Преднізолон вводили в дозі, що становить 10 мг/кг, перорально (PO) один раз на день (SID).

35 Фігура 18C являє собою графік, на якому показано, що у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 у дозі, що становить 15 мг/кг IP 2 рази на тиждень, значущо продовжувалося виживання, як показано за допомогою відсотка виживання. Середовище PBS, яке вводили IP 2 рази на тиждень, застосовували як контроль. Преднізолон вводили перорально (PO) один раз на день (SID).

40 Фігура 19A являє собою графік, на якому показано, що вироблення слини зберігається під час профілактичного лікування за допомогою антитіла 138 за дози, що становить 15 мг/кг IP 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг 2 рази на тиждень, 15 мг/кг 1х/тиждень. Середовище PBS застосовували як контроль. Преднізолон вводили за дози, що становить 10 мг/кг. Вироблення слини у мишей NZBWF-1 віком 7 тижнів, які являли собою більш молодих мишей, що не захворіли, застосовували як показник для подальшого порівняння. Визначали кількість слини (мг). Вироблення слини у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла до CD40, було порівняно постійним.

45 Фігура 19B являє собою графік, на якому показано, що об'єм слини зберігається під час профілактичного лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 за дози, що становить 15 мг/кг IP 2 рази на тиждень, 1,5 мг/кг 2 рази на тиждень, 15 мг/кг 1х/тиждень. Середовище PBS застосовували як контроль. Преднізолон вводили за дози, що становить 10 мг/кг. Визначали співвідношення об'єм слини/вага тіла (мг/г). Вироблення слини у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла до CD40, було значно більшим, ніж у необроблених контрольних мишей.

50 Фігура 20A являє собою графік, на якому показано, що вироблення слини зберігалось під час терапевтичного лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 за дози, що становить 15 мг/кг. Преднізолон вводили за дози, що становить 10 мг/кг. Вироблення слини у мишей віком 11 тижнів застосовували як показник для подальшого порівняння. Визначали кількість слини (мг).

60 Фігура 20B являє собою графік, на якому показано, що вироблення слини зберігалось під час терапевтичного лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 за дози, що становить 15

мг/кг. Преднізолон вводили за дози, що становить 10 мг/кг. Вироблення слини у мишей віком 11 тижнів застосовували як показник для подальшого порівняння. Визначали співвідношення об'єму слини/вага тіла (мг/г).

Докладний опис винаходу

Даний винахід стосується антитіл-антагоністів до CD40 або їхніх антиген-зв'язувальних частин, а також способів їх застосовування. Різні аспекти даного винаходу стосуються антитіл і фрагментів антитіл і фармацевтичних композицій на їхній основі, а також нуклеїнових кислот, рекомбінантних векторів експресії і клітин-хазяїнів для одержання таких антитіл і фрагментів. Способи застосування антитіл за даним винаходом для виявлення CD40 людини, для пригнічування активності CD40/CD40L людини як *in vitro*, так і *in vivo* і для запобігання захворюванням або порушенням або лікування їх, таких як хронічне запальне захворювання і хвороба Крона, також охоплюються даним винаходом.

Якщо у даному документі не визначено інше, то наукові і технічні терміни, що застосовуються у зв'язку з даним винаходом, матимуть значення, які в більшості випадків розуміють звичайні фахівці у даній галузі. Проте значення і обсяг термінів повинні бути чіткими в разі будь-якої прихованої двозначності, при цьому визначення, передбачені у даному документі, мають переваги над будь-яким словниковим або стороннім визначенням. До того ж якщо з контексту не вимагається інше, то терміни в однині будуть включати множину, а терміни в множині будуть включати однину. У даній заявці застосування "або" означає "та/або", якщо не вказано інше. До того ж застосування терміну "включаючи", а також інших форм, таких як "включає" і "включений", не є обмежувальним. Також терміни, такі як "елемент" або "компонент", охоплюють як елементи і компоненти, що становлять єдине ціле, так і елементи і компоненти, які містять більше від однієї субоддиниці, якщо спеціально не вказано інше.

Загалом термінології та методики, пов'язані з культурою клітин і тканин, молекулярною біологією, імунологією, мікробіологією, генетикою, а також хімією і гібридизацією білків і нуклеїнових кислот, описані у даному документі, добре відомі і зазвичай застосовуються у даній галузі техніки. Способи та методики за даним винаходом проводять загалом згідно з традиційними способами, добре відомими з рівня техніки, і як описано в різних загальних і більш спеціальних бібліографічних посиланнях, які процитовані і обговорюються по всьому даному опису, якщо не вказано інше. Ферментативні реакції і методики очищення проводять згідно з інструкціями виробника, як зазвичай здійснюється в даній галузі техніки або як описано у даному документі. Застосовувані термінології і лабораторні процедури та методики, пов'язані з аналітичною хімією, хімією органічного синтезу та медичною і фармацевтичною хімією, описані у даному документі, добре відомі і зазвичай застосовуються у даній галузі техніки. Для хімічних синтезів, хімічних аналізів, одержання лікарських препаратів, складання лікарських форм, а також доставки і лікування пацієнтів застосовують стандартні методики.

Таким чином, щоб можна було легше зрозуміти даний винахід, нижче наведені визначення окремих термінів.

Використовуваний у даному документі термін "поліпептид" означає будь-який полімерний ланцюг з амінокислот. Терміни "пептид" і "білок" використовуються взаємозамінно з терміном "поліпептид" і також означають полімерний ланцюг з амінокислот. Термін "поліпептид" охоплює природні або штучні білки, фрагменти білків і аналоги поліпептидів із білковою послідовністю. Поліпептид може бути мономерним або полімерним.

Термін "виділений білок" або "виділений поліпептид" являє білок або поліпептид, які внаслідок їх походження або джерела одержання не асоційовані з природними асоційованими компонентами, які супроводжують їх у їх природному стані; практично не містять інших білків того ж виду; експресуються клітиною іншого виду або не існують у природі. Так, поліпептид, який синтезований хімічним шляхом або синтезований у клітинній системі, відмінний від клітини, з якої він походить у природі, буде "виділеним" з його природних асоційованих компонентів. Білок також можна обробити так, щоб він практично не містив природних асоційованих компонентів, шляхом виділення із застосуванням методик очищення білка, добре відомих із рівня техніки. Прикладом виділеного поліпептиду є виділене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина.

Використовуваний у даному документі термін "вилучення" означає процес обробки хімічної молекули, такої як поліпептид, щоб вона практично не містила природних асоційованих компонентів, шляхом виділення, наприклад, із застосуванням методик очищення білка, добре відомих із рівня техніки.

Використовувані у даному документі терміни "CD40 людини" і "CD40 дикого типу людини" (у даному документі скорочені як hCD40, hCD40wt) означають трансмембранний білок I типу. В одному варіанті здійснення мається на увазі, що термін CD40 людини включає рекомбінантний

CD40 людини (rhCD40), який можна отримати за допомогою стандартних способів рекомбінантної експресії. У таблиці 1 представлена амінокислотна послідовність CD40 людини (тобто SEQ ID NO. 1) і її позаклітинного домену (тобто SEQ ID NO:107), які відомі з рівня техніки.

ТАБЛИЦЯ 1

Послідовність CD40 людини

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO.:1	CD40 людини	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETETCLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQ KGTSETDTICTCEEHWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATG VSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTD VVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKARHPKQEPQE INFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
SEQ ID NO.:107	Позаклітинний домен CD40 людини	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSCTEFTETETCLPCGESEFL DTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEHWHCTSEA CESCV

5

Термін "біологічна активність", використовуваний у даному документі, означає всі невід'ємні біологічні властивості CD40-рецептора. Біологічні властивості CD40 включають без обмежень зв'язування CD40L; участь у розвитку В-клітин; участь в активації лімфоцитів; участь у функціонуванні антиген-презентувальних клітин; регуляцію активності дендритних клітин, макрофагів і В-клітин; індукування вироблення запальних цитокінів у макрофагах і дендритних клітинах; підвищувальну регуляцію презентування антигена; підвищувальну регуляцію стимуляції Т-клітин і сприяння перемикаючому класу імуноглобулінів у В-клітинах.

10

Терміни "специфічне зв'язування" або "специфічно зв'язаний", використовувані у даному документі, щодо взаємодії антитіла, білка або пептиду з другою хімічною молекулою, означають, що взаємодія залежить від наявності конкретної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопу) на хімічній молекулі; наприклад, антитіло розпізнає і зв'язується зі специфічною білковою структурою, а не з білками загалом. Якщо антитіло є специфічним щодо епітопу "А", то наявність молекули, що містить епітоп А (або вільний, немічений А), у реакції, до складу якої входять мічений "А" і антитіло, буде знижувати кількість міченого А, зв'язаного з антитілом.

15

20

Термін "агоніст", використовуваний у даному документі, означає модулятор, який під час контакту з молекулою, що становить інтерес, наприклад CD40, викликає підвищення сили певної активності або функції молекули порівняно із силою активності або функції, яка спостерігається за відсутності агоніста.

25

Терміни "антагоніст" або "інгібітор", використовувані у даному документі, означають модулятор, який під час контакту з молекулою, що становить інтерес, викликає зниження сили певної активності або функції молекули порівняно із силою активності або функції, яка спостерігається за відсутності антагоніста. Конкретні антагоністи, що становлять інтерес, включають ті, що блокують або модулюють біологічну або імунологічну активність CD40 людини (hCD40). Антитіло-антагоніст hCD40, наприклад, може пригнічувати підвищення рівня CD86 на первинних В-клітинах людини, які культивують за наявності (або піддають дії) CD40L (як, наприклад, культивування В-клітин з Т-клітинами людини, що експресують CD40L). В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, які практично не проявляють агоністичної активності, визначені як такі, що характеризуються рівнем активності, який еквівалентний або знаходиться в межах одного стандартного відхилення від негативного контролю в аналізі на агоністичну активність, такому як аналіз на агоністичну активність із застосуванням моноцитів, описаний у прикладі 7.

30

35

Антитіло або його антиген-зв'язувальна частина за даним винаходом являють собою антитіло-антагоніст або його антиген-зв'язувальну частину, які викликають зниження активності або функції CD40 порівняно з активністю або функцією CD40 за відсутності антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. У конкретних варіантах здійснення антитіло або його антиген-

40

зв'язувальна частина практично не проявляють агоністичної активності, тобто антитіло або його антиген-зв'язувальна частина не викликають збільшення сили активності або функції CD40 порівняно з активністю або функцією CD40 за відсутності антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. Агоністичну й антагоністичну активність також можна оцінювати із застосуванням способів, відомих із рівня техніки, наприклад із застосуванням CD40-експресувальної лінії клітин із геном-репортером, яка експресує CD40 людини, пов'язаний з NFκB-активованою лужною фосфатазою (AP), або аналіз із застосуванням В-клітин. Також в одному варіанті здійснення агоністичну та антагоністичну активність можна оцінювати із застосуванням *in vitro* аналізів на агоністичну і антагоністичну активність із застосуванням моноцитів, описаних у прикладі 7.

Термін "пригнічувати зв'язування з CD40L" означає здатність антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента запобігати зв'язуванню CD40 з лігандом, CD40L. Таке пригнічування зв'язування з CD40L буде приводити до зменшення або зникнення біологічної активності, опосередкованої зв'язуванням CD40 із CD40L.

Термін "антитіло", використовуваний у даному документі, в широкому сенсі означає будь-яку молекулу імуноглобуліну (Ig), складену з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких (H) ланцюгів і двох легких (L) ланцюгів, або її будь-який функціональний фрагмент, мутант, варіант або похідне, які зберігають необхідні ознаки зв'язування епітопів молекули Ig. Дані мутантні, варіантні або похідні формати антитіла відомі з рівня техніки. Необмежувальні варіанти здійснення таких обговорюються нижче.

У повнорозмірному антитілі кожний важкий ланцюг складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга (у даному документі скороченої як HCVR або VH) і константної ділянки важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів – CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга (у даному документі скороченої як LCVR або VL) і константної ділянки легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену – CL. VH- і VL-ділянки можна додатково розділити на ділянки гіперваріабельності, що називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які перемежуються з ділянками, які є більш консервативними, що називають каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекули імуноглобулінів можуть належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), класу (наприклад, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласу.

Терміни "антиген-зв'язувальна частина" або "антиген-зв'язувальний фрагмент" антитіла (або просто "частина антитіла" або "фрагмент антитіла"), використовувані у даному документі, означають один або декілька фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, hCD40). Було показано, що антиген-зв'язувальну функцію антитіла можуть здійснювати фрагменти повнорозмірного антитіла. Такі варіанти здійснення антитіла також можуть мати формати біспецифічного антитіла, антитіла з подвійною специфічністю або мультиспецифічного антитіла; зокрема вони можуть зв'язуватися з двома або більше різними антигенами. Приклади зв'язувальних фрагментів, які охоплюються термінами "антиген-зв'язувальна частина" або "антиген-зв'язувальний фрагмент" антитіла, включають (i) Fab-фрагмент, моновалентний фрагмент, що складається з VL-, VH-, CL- і CH1-доменів; (ii) F(ab')₂-фрагмент, бівалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, зв'язаних дисульфідним містком у шарнірній ділянці; (iii) Fd-фрагмент, що складається з VH- і CH1-доменів; (iv) Fv-фрагмент, що складається з VL- і VH-доменів одного плеча антитіла, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., публікація згідно з PCT WO 90/05144 A1, включена в даний документ за допомогою посилання), який містить один варіабельний домен; і (vi) виділену ділянку, що визначає компліментарність (CDR). Крім того, хоча два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати із застосуванням рекомбінантних способів за допомогою синтетичного лінкера, який забезпечує можливість одержувати їх у вигляді єдиного білкового ланцюга, в якому VL- і VH-ділянки утворюють пару з формуванням моновалентних молекул (відомих як одноланцюговий Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; і Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Мається на увазі, що ці одноланцюгові антитіла також охоплюються термінами "антиген-зв'язувальна частина" або "антиген-зв'язувальний фрагмент" антитіла. Також охоплюються інші форми одноланцюгових антитіл, такі як діатіла. Діатіла являють собою бівалентні, біспецифічні антитіла, в яких VH- і VL-домени експресуються на єдиному поліпептидному ланцюгу, але за допомогою лінкера, який є занадто коротким, щоб забезпечити можливість утворення пари між двома доменами одного ланцюга, змушуючи тим самим домени утворювати пару з комплементарними доменами іншого ланцюга і створюючи два антиген-

зв'язувальних сайти (див., наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Такі зв'язувальні частини антитіл відомі з рівня техніки (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

5 Термін "конструкція антитіла", використовуваний у даному документі, означає поліпептид, що містить одну або декілька антиген-зв'язувальних частин за даним винаходом, зв'язаних із лінкерним поліпептидом або константним доменом імуноглобуліну. Лінкерні поліпептиди містять два або більше амінокислотних залишки, сполучених пептидними зв'язками, і застосовуються для того, щоб з'єднувати одну або декілька антиген-зв'язувальних частин. Такі лінкерні
10 поліпептиди добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Константний домен імуноглобуліну означає константний домен важкого або легкого ланцюга. Амінокислотні послідовності константних доменів важкого ланцюга і легкого ланцюга IgG людини відомі з рівня техніки і представлені в таблиці 2.

15

ТАБЛИЦЯ 2

Послідовність константного домену важкого ланцюга
і константного домену легкого ланцюга IgG людини

Блок	Ідентифі- катор послідов- ності	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
Константна ділянка гамма-1-ланцюга Ig	SEQ ID NO.:2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Мутантна константна ділянка гамма-1-ланцюга Ig	SEQ ID NO.:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константна ділянка каппа-ланцюга Ig	SEQ ID NO.:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Константна ділянка лямбда-ланцюга Ig	SEQ ID NO.:81	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS

До того ж антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть становити частину більших молекул імунної адгезії, утворених за допомогою ковалентної або нековалентної асоціації антитіла або частини антитіла з одним або кількома іншими білками або пептидами.
20 Приклади таких молекул імунної адгезії включають застосування центральної ділянки на основі стрептавідину для одержання тетрамерної молекули scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) і застосування цистеїнового залишку, маркерного пептиду і С-термінальної поліістидинової мітки для одержання бівалентних і біотинільованих молекул scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Частини антитіла, такі як Fab- і
25 F(ab')₂-фрагменти, можна одержувати з цілого антитіла із застосуванням традиційних методик, таких як розщеплення цілого антитіла відповідно папаїном або пепсином. До того ж антитіла, частини антитіла і молекули імунної адгезії можна одержувати із застосуванням стандартних методик рекомбінантної ДНК, описуваних у даному документі.

Мається на увазі, що термін "виділене антитіло", використовуваний у даному документі, означає антитіло, яке практично не містить інших антитіл з іншою антигенною специфічністю (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язує hCD40, практично не містить антитіл, які специфічно зв'язують антигени, відмінні від hCD40). Однак виділене антитіло, яке специфічно зв'язує hCD40, може характеризуватися перехресною реактивністю щодо інших антигенів, таких як молекули CD40 від інших видів. До того ж виділене антитіло може практично не містити інших клітинних матеріалів та/або хімічних речовин.

Термін "химерне антитіло" означає антитіла, які містять послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів від одного виду, а послідовності константних ділянок від іншого виду, як, наприклад, антитіла з мишачими варіабельними ділянками важкого і легкого ланцюгів, зв'язані з константними ділянками людини.

Термін "CDR-прищеплене антитіло" означає антитіла, які містять послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів від одного виду, але в цих послідовностях одна або декілька CDR-ділянок VH та/або VL замінені послідовностями CDR від іншого виду, як, наприклад, антитіла з мишачими варіабельними ділянками важкого і легкого ланцюгів, в яких одна або декілька CDR миші (наприклад, CDR3) була замінена послідовностями CDR людини.

Терміни "нумерація згідно з Kabat", "визначення згідно з Kabat" і "мічення згідно з Kabat" використовуються у даному документі взаємозамінно. Ці терміни, які є прийнятими в даній галузі техніки, означають систему нумерації амінокислотних залишків, які є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних ділянках важкого і легкого ланцюгів антитіла або його антиген-зв'язувальної частини (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 і Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). У випадку варіабельної ділянки важкого ланцюга гіперваріабельна ділянка розташована в межах амінокислотних положень 31-35 для CDR1, амінокислотних положень 50-65 для CDR2 і амінокислотних положень 95-102 для CDR3. У разі варіабельної ділянки легкого ланцюга гіперваріабельна ділянка розташована в межах амінокислотних положень 24-34 для CDR1, амінокислотних положень 50-56 для CDR2 і амінокислотних положень 89-97 для CDR3.

Терміни "акцептор" і "акцепторне антитіло", використовувані у даному документі, означають послідовність антитіла або нуклеїнової кислоти, яка забезпечує або кодує щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних ділянок. У деяких варіантах здійснення термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або послідовність нуклеїнової кислоти антитіла, які забезпечують або кодують константну(-і) ділянку(-и). У ще одному варіанті здійснення термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або послідовність нуклеїнової кислоти антитіла, які забезпечують або кодують одну або декілька каркасних ділянок і константних ділянок. У конкретному варіанті здійснення термін "акцептор" означає амінокислотну послідовність або послідовність нуклеїнової кислоти антитіла людини, які забезпечують або кодують щонайменше 80 %, переважно щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних ділянок. Згідно з даним варіантом здійснення акцептор може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 10 амінокислотних залишків, які не зустрічаються в одному або декількох конкретних положеннях антитіла людини. Каркасна ділянка акцептора та/або константна(-і) ділянка(-и) акцептора, наприклад, можуть походити або бути одержані із зародкового гена антитіла, гена зрілого антитіла, функціонального антитіла (наприклад, антитіл, добре відомих із рівня техніки, антитіл, які перебувають у розробці, або антитіл, доступних комерційно).

Термін "CDR", використовуваний у даному документі, означає ділянку, що визначає компліментарність, у межах варіабельних послідовностей антитіла. У кожній варіабельній ділянці важкого ланцюга і легкого ланцюга є по три CDR, які позначаються як CDR1, CDR2 і CDR3 для кожної з варіабельних ділянок. Термін "набір CDR", використовуваний у даному документі, означає групу з трьох CDR, які знаходяться в одній варіабельній ділянці, здатній зв'язувати антиген. Точні межі цих CDR були по-різному визначені в різних системах. Система, описана згідно з Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) і (1991))), не лише забезпечує однозначну систему нумерації залишків, яка застосовується до будь-якої варіабельної ділянки антитіла, але забезпечує також точні межі залишків, що визначають три CDR. Ці CDR можна позначати як CDR згідно з Kabat. Chothia і співробітники (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) і Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) виявили, що певні субфрагменти в межах CDR згідно з Kabat проявляють майже ідентичну конформацію пептидного остова, незважаючи на те, що

характеризуються великою різноманітністю на рівні амінокислотної послідовності. Ці субфрагменти були позначені як L1, L2 і L3 або H1, H2 і H3, де "L" і "H" означають відповідно ділянки легкого ланцюга і важкого ланцюга. Ці ділянки можуть позначатися як CDR згідно з Chothia, які мають межі, що перекриваються з CDR згідно з Kabat. Інші межі, що визначають CDR, які перекриваються з CDR згідно з Kabat, були описані в Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) і MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Також інші визначення меж CDR можуть не точно відповідати одній із вищеперерахованих систем, але все ж будуть перекриватися з CDR згідно з Kabat, хоча вони можуть бути вкорочені або подовжені у контексті прогнозів або експериментальних відомостей про те, що конкретні залишки або групи залишків або навіть CDR повністю не впливають значною мірою на зв'язування антигена. У способах, що застосовуються у даному документі, можуть використовуватися CDR, визначені згідно з будь-якою з цих систем, хоча в переважних варіантах здійснення застосовуються CDR, визначені згідно з Kabat або Chothia.

Термін "канонічний" залишок, використовуваний у даному документі, означає залишок у CDR або каркасній ділянці, який визначає конкретну канонічну структуру CDR, визначену в Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), обидва включені в даний документ за допомогою посилання). Згідно з Chothia et al., найважливіші частини CDR багатьох антитіл характеризуються майже ідентичними конформаціями пептидного остова, незважаючи на велику різноманітність на рівні амінокислотної послідовності. Кожна канонічна структура зумовлює передусім набір торсійних кутів пептидного остова для безперервного сегмента з амінокислотних залишків, що утворюють петлю.

Терміни "донор" і "донорне антитіло", використовувані у даному документі, означають антитіло, що забезпечує одну або декілька CDR. У переважному варіанті здійснення донорне антитіло являє собою антитіло від виду, відмінного від того, з якого взяте антитіло, від якого одержані або походять каркасні ділянки. У контексті гуманізованого антитіла термін "донорне антитіло" означає антитіло від організму, відмінного від людини, яке забезпечує одну або декілька CDR.

Терміни "каркасна ділянка" або "послідовність каркасної ділянки", використовувані у даному документі, означають інші послідовності варіабельної ділянки, за винятком CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR може бути зумовлене різними системами, сенс виразу "послідовність каркасної ділянки" встановлюється відповідно до різних інтерпретацій. Шість CDR (CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 із легкого ланцюга і CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 із важкого ланцюга) також ділять каркасні ділянки легкого ланцюга і важкого ланцюга на чотири підділянки (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюгу, в якому CDR1 розташований між FR1 і FR2, CDR2 між FR2 і FR3, а CDR3 між FR3 і FR4. Без вказання конкретних підділянок як FR1, FR2, FR3 або FR4 каркасна ділянка, як позначено в інших випадках, представляє об'єднані FR у межах варіабельної ділянки одиночного ланцюга імунoglobulinу, що зустрічається в природі. Термін "одна FR", використовуваний у даному документі, представляє одну з чотирьох підділянок, а "декілька FR" представляють дві або більше з чотирьох підділянок, що складають каркасну ділянку.

Акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини відомі з рівня техніки. В одному варіанті здійснення даного винаходу акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини вибрані з послідовностей, описаних у таблиці 3 і таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 3

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID No.	Ділянка білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
82	VH1-18&JH6 FR1	qvqlvqsgaevkpgasvksckasgytft
83	VH1-18&JH6 FR2	wvrqapggglewmg
84	VH1-18&JH6 FR3	rvtmttdtststaymelrslrsddtavyyca
85	VH1-18&JH6 FR4	wgggtltvss
82	21/28&JH4 FR1	qvqlvqsgaevkpgasvksckasgytft
86	21/28&JH4 FR2	wvrqapggqlwmg
87	21/28&JH4 FR3	rvtitrdtsastaymelsslrdsdtavyyca
88	21/28&JH4 FR4	wgggtltvss
89	VH2-26&JH6 FR1	qvtkesgpvlvktetlttctvsgfsls

ТАБЛИЦЯ 3

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID No.	Ділянка білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
90	VH2-26&JH6 FR2	wirqppgkalewlah
91	VH2-26&JH6 FR3	rltiskdtsksqvvltmtnmdpvdatyycar
85	VH2-26&JH6 FR4	wgggttvtvss
92	M60&JH4 FR1	qvltresgpalkvptqtlitctlygfsls
93	M60&JH4 FR2	wirqppgkalewla
94	M60&JH4 FR3	rltiskdtsknqvvltmtnmdpvdatyycar
88	M60&JH4 FR4	wgggtlvtvss
82	VH1-46&JH6 FR1	qvqlvqsgaevkpgasvkvscasgytft
83	VH1-46&JH6 FR2	wvrqapggglewmg
95	VH1-46&JH6 FR3	rvtmtrdtststvmelsslrstedavyycar
85	VH1-46&JH6 FR4	wgggttvtvss

ТАБЛИЦЯ 4

Акцепторні послідовності легкого ланцюга

SEQ ID No.	Ділянка білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
96	A20&JK4 FR1	dqmtqspsslsasvgrvtitc
97	A20&JK4 FR2	wyqqkpgkvpklliy
98	A20&JK4 FR3	gvpsrfsqsgsgtdftitisslqpedvatyycc
99	A20&JK4 FR4	fgggtkveikr
96	III-3R&JK4 FR1	dqmtqspsslsasvgrvtitc
114	III-3R&JK4 FR2	wyqqkpgkapklliy
100	III-3R&JK4 FR3	gvpsrfsqsgsgtdftitisslqpediatyycc
99	III-3R&JK4 FR4	fgggtkveikr
101	A1&JK4 FR1	dvvmqtqspslpvtlqgpasisc
102	A1&JK4 FR2	wfqqrpgqsprrlii
103	A1&JK4 FR3	gvpdfsfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycc
99	A1&JK4 FR4	fgggtkveikr
104	01&JK2 FR1	divmtqtplslpvtlpgepasisc
105	01&JK2 FR2	wylqkpgqspqlliy
103	01&JK2 FR3	gvpdfsfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycc
106	01&JK2 FR4	fgggtkleikr

Терміни "зародковий ген антитіла" або "генний фрагмент", використовувані у даному документі, означають послідовність імуноглобуліну, закодовану в клітинах, відмінних від лімфоїдних, які не піддалися процесу дозрівання, який приводить до генетичної перебудови і мутацій для експресії конкретного імуноглобуліну. (Див, наприклад, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Одна з переваг, які забезпечуються різними варіантами здійснення даного винаходу, виходить із розуміння того, що зародкові гени антитіла з більшою ймовірністю, ніж гени зрілого антитіла, зберігають необхідну структуру амінокислотних послідовностей, характерну для особин даного виду, отже, вони з меншою ймовірністю будуть вважатися такими, що походять із чужорідного джерела під час терапевтичного застосування у даного виду.

Термін "ключові" залишки, використовуваний у даному документі, означає певні залишки в межах варіабельної ділянки, які мають великий вплив на специфічність та/або афінність зв'язування антитіла, зокрема гуманізованого антитіла. Ключовий залишок включає без обмежень одне або декілька з наступного: залишок, який є суміжним із CDR, потенційний сайт глікозилювання (може являти собою сайт або N-, або O-глікозилювання), рідкісний залишок, залишок, здатний взаємодіяти з антигеном, залишок, здатний взаємодіяти з CDR, канонічний залишок, контактний залишок між варіабельною ділянкою важкого ланцюга і варіабельною

ділянкою легкого ланцюга, залишок у межах зони Vernier і залишок у ділянці, яка перекривається між визначенням згідно з Chothia CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга і визначенням згідно з Kabat першої каркасної ділянки важкого ланцюга.

Термін "гуманізоване антитіло", використовуваний у даному документі, являє собою антитіло або його варіант, похідне, аналог або фрагмент, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном, що становить інтерес (наприклад, CD40 людини), і які містять каркасну (FR) ділянку з амінокислотною послідовністю, яка практично являє собою таку антитіла людини, і ділянку, що визначає компліментарність (CDR), з амінокислотною послідовністю, яка практично являє собою таку з антитіла виду, відмінного від людини. Термін "практично", використовуваний у даному документі, в контексті CDR означає CDR з амінокислотною послідовністю, яка щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентична амінокислотній послідовності CDR з антитіла виду, відмінного від людини. Гуманізоване антитіло містить практично всі зі щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), в яких усі або практично всі CDR-ділянки відповідають таким з імунoglobulinу виду, відмінного від людини (тобто донорного антитіла), і всі або практично всі каркасні ділянки є такими з консенсусною послідовністю імунoglobulinу людини. Переважно гуманізоване антитіло також містить щонайменше частину константної ділянки (Fc) імунoglobulinу, як правило таку імунoglobulinу людини. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить як легкий ланцюг, так і щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Антитіло також може включати CH1-, шарнірну, CH2-, CH3- і CH4-ділянки важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований легкий ланцюг. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований важкий ланцюг. У конкретних варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга та/або гуманізований важкий ланцюг.

Гуманізоване антитіло може бути вибрано з будь-якого класу імунoglobulinів, у тому числі IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, у тому числі без обмежень IgG 1, IgG2, IgG3 і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більш ніж одного класу або ізотипу, і конкретні константні домени для оптимізації потрібних ефекторних функцій можуть бути вибрані із застосуванням методик, добре відомих із рівня техніки.

Каркасна ділянка та CDR-ділянки гуманізованого антитіла не повинні точно відповідати вихідним послідовностям, наприклад, CDR донорного антитіла або консенсусної каркасної ділянки можуть бути піддані мутагенезу за допомогою заміни, вставки та/або делеції щонайменше одного амінокислотного залишку, таким чином, залишок CDR або каркасної ділянки в даному сайті не відповідає ні донорному антитілу, ні консенсусній каркасній ділянці. Однак у переважному варіанті здійснення такі мутації не будуть поширеними. Зазвичай щонайменше 80 %, переважно щонайменше 85 %, більш переважно щонайменше 90 % і найбільш переважно щонайменше 95 % залишків у гуманізованому антитілі будуть відповідати залишкам у послідовності вихідних FR і CDR. Термін "консensusна каркасна ділянка", використовуваний у даному документі, означає каркасну ділянку в консенсусній послідовності імунoglobulinу. Термін "консensusна послідовність імунoglobulinу", використовуваний у даному документі, означає послідовність, утворену з амінокислот, що зустрічаються найчастіше (або нуклеотидів), у родині споріднених послідовностей імунoglobulinу (див., наприклад, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)). У родині імунoglobulinів кожне положення в консенсусній послідовності зайняте амінокислотою, яка зустрічається найчастіше в даному положенні у даної родини. Якщо дві амінокислоти зустрічаються з однаковою частотою, то будь-яка з них може бути включена в консенсусну послідовність.

Термін "зона Vernier", використовуваний у даному документі, означає підмножину із залишків каркасної ділянки, які можуть регулювати структуру CDR і оптимізувати підгонку до антигена, як описано у Foote and Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, який включено у даний документ за допомогою посилання). Залишки із зони Vernier утворюють шар, що підстилає CDR, і можуть впливати на структуру CDR і афінність антитіла.

Термін "мультивалентний зв'язувальний білок" використовують у даному описі для позначення зв'язувального білка, що містить два або більше антиген-зв'язувальних сайти. Мультивалентний зв'язувальний білок переважно розробляють так, щоб він мав три або більше антиген-зв'язувальних сайти, і зазвичай він являє собою антитіло, що не зустрічається в природі. Термін "мультиспецифічний зв'язувальний білок" означає зв'язувальний білок, здатний зв'язувати дві або більше споріднені або неспоріднені мішені.

Терміни "подвійний варіабельний домен", або "DVD", або "DVD-Ig", використовувані у даному документі взаємозамінно, являють собою антиген-зв'язувальні білки, які містять два або

більше антиген-зв'язувальних сайти і є тетравалентними або мультівалентними зв'язувальними білками. Такі DVD можуть бути моноспецифічними, тобто здатними зв'язувати один антиген, або мультиспецифічними, тобто здатними зв'язувати два або більше антигени. DVD-зв'язувальні білки, що містять два DVD-поліпептиди важкого ланцюга і два DVD-поліпептиди легкого ланцюга, позначаються як DVD-Ig. Кожна половина DVD-Ig містить DVD-поліпептид важкого ланцюга і DVD-поліпептид легкого ланцюга, а також два антиген-зв'язувальних сайти. Кожний зв'язувальний сайт містить варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга, які містять в загалом 6 CDR, залучених у зв'язування антигена, на антиген-зв'язувальний сайт. В одному варіанті здійснення CDR, описані у даному документі (наприклад, SEQ ID NO:6, 42 і 8 (важкий ланцюг) і 21, 11 і 12 (легкий ланцюг)), застосовуються в DVD до CD40. Приклади структур DVD-Ig відомі з рівня техніки і описані, наприклад, у патенті США № 7612181, який включений у даний документ за допомогою посилання.

Термін "здійснення нейтралізації", використовуваний у даному документі, означає нейтралізацію біологічної активності цитокінового рецептора, коли антитіло або його антиген-зв'язувальна частина специфічно зв'язують цитокіновий рецептор. Переважно нейтралізувальне антитіло або його антиген-зв'язувальна частина являють собою нейтралізувальне антитіло, зв'язування якого з hCD40 приводить до пригнічування біологічної активності hCD40. Переважно нейтралізувальне антитіло або його антиген-зв'язувальна частина зв'язують hCD40 і знижують біологічну активність hCD40 щонайменше на приблизно 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % або більше. Пригнічування біологічної активності hCD40 за допомогою нейтралізувального антитіла або його антиген-зв'язувальної частини можна оцінювати шляхом вимірювання одного або декількох індикаторів біологічної активності hCD40, добре відомих із рівня техніки.

Термін "активність" включає види активності, такі як специфічність/афінність зв'язування антитіла з антигеном, наприклад антитіла до hCD40, яке зв'язується з антигеном hCD40, та/або нейтралізує ефективність антитіла, наприклад антитіла до hCD40, зв'язування якого з hCD40 пригнічує біологічну активність hCD40, наприклад зв'язування CD40L; участь у розвитку В-клітин; участь в активації лімфоцитів; участь у функціонуванні антиген-презентувальних клітин; регуляція активності дендритних клітин, макрофагів і В-клітин; індукування вироблення запальних цитокінів у макрофагах і дендритних клітинах; підвищувальну регуляцію презентування антигена; підвищувальну регуляцію стимуляції Т-клітин і сприяння перемиканню класу імуноглобулінів у В-клітинах.

Ілюстративні аналізи для оцінки активності антитіл до CD40 за даним винаходом включають *in vitro* та *in vivo* аналізи, викладені у даному документі. Зокрема, аналізи можна застосовувати для визначення того, чи є антитіло до CD40 антитілом-агоністом або антитілом-антагоністом.

Наприклад, зв'язування з CD40 людини і пригнічування взаємодії CD40-CD40L можна проаналізувати із застосуванням лінії клітин, що експресують CD40 людини, за допомогою FACS-аналізів. Антагоністичну та агоністичну активності можна оцінювати із застосуванням CD40-експресувальної лінії клітин із геном-репортером, яка експресує CD40 людини, зв'язаний із NFκB-активованою лужною фосфатазою (AP). Якщо сигнал одержано завдяки CD40, то активація NFκB приводить до секреції AP, яку вимірюють за допомогою колориметричного субстрату. Як ілюстративний аналіз на антагоністичну активність, лінію клітин із геном-репортером для виявлення CD40 можна культивувати або з лінією клітин Jurkat, що експресують CD40L (для забезпечення фізіологічної взаємодії з лігандом), або з розчинним CD40L, і можна оцінювати здатність антитіл до CD40 блокувати сигнал з участю NFκB. Як ілюстративний аналіз на агоністичну активність лінію клітин із геном-репортером для виявлення CD40 людини можна обробляти за допомогою антитіл до CD40 і вимірювати сигнал з участю NFκB, як описано вище.

Як альтернативу можна використовувати аналіз на агоністичну активність із застосуванням В-клітин, за якого В-клітини активують за допомогою низької дози антитіла до IgM і IL4 перед додаванням антитіла-антагоніста до CD40. Посилення активації В-клітин можна вимірювати як підвищення рівня CD86, що, зі свого боку, вказує на агоністичну активність. Аналогічно можна використовувати аналіз на антагоністичну активність із застосуванням В-клітин, в якому первинні В-клітини людини культивують із лінією Т-клітин людини, яка експресує CD40L, що приводить до активації В-клітин і підвищення рівня експресії CD86 внаслідок взаємодії CD40/CD40L. Пригнічування підвищення рівня CD86 у первинних В-клітинах людини вказує на антагоністичну активність.

Термін "епітоп" включає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну забезпечувати специфічне зв'язування з антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною. У певних варіантах здійснення епітопні детермінанти включають хімічно активні поверхневі групи

молекул, таких як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорильна або сульфонільна групи, і в певних варіантах здійснення можуть мати специфічні характеристики тривимірної структури та/або специфічні характеристики заряду. У різних варіантах здійснення епітоп може являти собою лінійний або послідовний епітоп, тобто лінійну послідовність з амінокислот, у первинній структурі антигена, тобто CD40. Як альтернатива, в інших варіантах здійснення епітоп може являти собою конформаційний епітоп зі специфічною тривимірною формою, коли антиген набуває своєї вторинної структури. Наприклад, конформаційний епітоп може містити нелінійні, тобто непослідовні амінокислоти антигена.

У конкретному варіанті здійснення епітоп являє собою ділянку антигена, яка зв'язується антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною. У певних варіантах здійснення йдеться про те, що антитіло або його антиген-зв'язувальна частина специфічно зв'язують антиген, коли вони переважно розпізнають свій антиген-мішень у складній суміші білків та/або макромолекул.

Мається на увазі, що термін "антитіло людини", використовуваний у даному документі, включає антитіла з варіабельними та константними ділянками, що походять від послідовностей імунoglobуліну зародкового типу людини. Антитіла людини за даним винаходом можуть включати амінокислотні залишки, які не заковані у послідовності імунoglobуліну зародкового типу людини (наприклад, мутації, введені за допомогою випадкового або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або за допомогою соматичного мутагенезу *in vivo*), наприклад у CDR і, зокрема, CDR3. Однак не мається на увазі, що термін "антитіло людини", використовуваний у даному документі, включає антитіла, в яких послідовності CDR, що походять із послідовностей зародкового типу іншого виду ссавців, такого як миша, були щеплені на послідовності каркасних ділянок людини.

Мається на увазі, що термін "рекомбінантне антитіло людини", використовуваний у даному документі, включає всі антитіла людини, які були одержані, експресовані, створені або виділені за допомогою засобів рекомбінантної технології, такі як антитіла, що експресуються із застосуванням вектора для рекомбінантної експресії, трансфікованого в клітину-хазяїна (описано далі в розділі IIC нижче), антитіла, виділені з рекомбінантної, комбінаторної бібліотеки антитіл людини (Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною за генами імунoglobуліну людини (див., наприклад, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370), або антитіла, які були одержані, експресовані, створені або виділені за допомогою будь-яких інших засобів, що передбачає сплайсинг послідовностей генів імунoglobуліну людини з іншими послідовностями ДНК. Ці рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні та константні ділянки, що походять від послідовностей імунoglobуліну зародкового типу людини. Проте у певних варіантах здійснення ці рекомбінантні антитіла людини піддаються *in vitro* мутагенезу (або під час застосування тваринного, трансгенного за послідовностями Ig людини, соматичного мутагенезу *in vivo*), і, таким чином, амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, хоча і походять із послідовностей VH і VL зародкового типу людини і споріднені з ними, можуть не існувати самі собою в межах репертуару антитіл зародкового типу людини *in vivo*. В одному варіанті здійснення передбачені повністю людські антитіла, здатні зв'язувати CD40 людини, які можна одержувати із застосуванням методик, добре відомих із рівня техніки, таких як без обмеження застосування фагових бібліотек Ig людини, таких як розкриті в Jermutus et al., публікація згідно з PCT № WO 2005/007699 A2.

Термін "поверхневий плазмонний резонанс", використовуваний у даному документі, означає оптичне явище, яке забезпечує можливість аналізу біоспецифічних взаємодій у режимі реального часу за допомогою виявлення змін концентрацій білка в межах матриці біосенсора, наприклад, із застосуванням системи BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеція і Піскаатавей, Нью-Джерсі, США). Більш докладні описи див. в Jönsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; i Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Мається на увазі, що термін " k_{on} ", використовуваний у даному документі, означає константу швидкості асоціації для об'єднання антитіла з антигеном з утворенням комплексу антитіло/антиген, як відомо з рівня техніки.

Мається на увазі, що термін " k_{off} ", використовуваний у даному документі, означає константу швидкості дисоціації для відокремлення антитіла від комплексу антитіло/антиген, як відомо з рівня техніки.

Мається на увазі, що термін "K_D", використовуваний у даному документі, означає константу дисоціації для конкретної взаємодії антитіло-антиген, як відомо з рівня техніки.

Термін "мічене антитіло", використовуваний у даному документі, означає антитіло зі включеною міткою, яка забезпечує ідентифікацію антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. Переважно мітка являє собою детектовний маркер, наприклад, включення амінокислоти з радіоактивною міткою або прикріплення до поліпептиду біотинільованих фрагментів, які можуть бути виявлені за допомогою міченого авідину (наприклад, стрептавідину, що містить флуоресцентний маркер або ферментативну активність, які можна виявити за допомогою оптичних або колориметричних способів). Приклади міток для поліпептидів включають без обмеження наступні: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, або ¹⁵³Sm); флуоресцентні мітки (наприклад, FITC, родамін, люмінофори на основі комплексів лантанідів), ферментативні мітки (наприклад, пероксидазу хрону, люциферазу, лужну фосфатазу); хемілюмінесцентні маркери; біотинільовані групи; заздалегідь установлені поліпептидні епітопи, що розпізнаються вторинним репортером (наприклад, послідовності пари лейцинових застібок, що зв'язують сайти для вторинних антитіл, метал-зв'язувальні домени, епітопні мітки); і магнітні засоби, такі як хелати гадолінію.

Терміни "кристал" і "кристалізоване", використовувані у даному документі, означають антитіло або його антиген-зв'язувальну частину, які існують у формі кристала. Кристали являють собою одну форму твердого стану речовини, яка відрізняється від інших форм, таких як аморфний твердий стан або рідкокристалічний стан. Кристали складені з правильних, повторюваних, тривимірних угруповань з атомів, іонів, молекул (наприклад, білків, таких як антитіла) або сукупностей молекул (наприклад, комплексів антиген/антитіло). Ці тривимірні угруповання розташовані відповідно до специфічних математичних залежностей, які добре відомі в даній галузі техніки. Основна одиниця або структурний елемент, який повторюється в кристалі, називається асиметричною одиницею. Повторення асиметричної одиниці в порядку, який підпорядковується даній, точно визначеній кристалографічній симетрії, забезпечує "елементарну комірку" кристала. Повторення елементарної комірки за допомогою регулярних переносів у всіх трьох напрямках утворює кристал. Див. Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)."

Термін "полінуклеотид", використовуваний у даному документі, означає полімерну форму з двох або більше нуклеотидів, або рибонуклеотидів, або дезоксинуклеотидів, або модифікованої форми будь-якого типу нуклеотиду. Термін включає одно- і двониткові форми ДНК, але переважно являє собою двониткову ДНК.

Під використанням у даному документі терміном "виділений полінуклеотид" слід розуміти полінуклеотид (наприклад, геномний, на основі cDNA або синтетичного походження або деяку їх комбінацію), який через своє походження як "виділений полінуклеотид" не асоційований з усім або частиною полінуклеотиду, з яким "виділений полінуклеотид" зустрічається в природі; функціонально пов'язаний із полінуклеотидом, з яким він не пов'язаний у природі, або не існує в природі як частина більшої послідовності.

Мається на увазі, що термін "вектор", використовуваний у даному документі, означає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона була зв'язана. Одним типом вектора є "плазмід", яка означає кільцеву петлю з двонитковою ДНК, в яку можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, де додаткові сегменти ДНК можуть бути ліговані у вірусний геном. Певні вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку їх ввели (наприклад, бактеріальні вектори з бактеріальною точкою початку реплікації та епісомні вектори ссавця). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавця) можуть бути інтегровані в геном клітини-хазяїна після введення в клітину-хазяїна і внаслідок цього реплікуються разом із геномом хазяїна. До того ж певні вектори здатні керувати експресією генів, з якими вони функціонально пов'язані. Такі вектори позначені в даному документі як "вектори для рекомбінантної експресії" (або просто – "вектори експресії"). Як правило, вектори експресії, що використовуються в методиках рекомбінантної ДНК, часто знаходяться у формі плазмід. У цій заявці "плазмід" і "вектор" можуть використовуватися як взаємозамінні, оскільки плазмід є найбільш часто використовуваною формою вектора. Однак мається на увазі, що в даний винахід включені інші подібні форми векторів експресії, такі як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси з дефектом за реплікацією, аденовіруси та аденоасоційовані віруси), які виконують еквівалентні функції.

Термін "функціонально пов'язаний" позначає суміжне розташування, де описані компоненти знаходяться у взаємозв'язку, що забезпечує їм можливість функціонувати властивим їм чином. Послідовність контролю, "функціонально пов'язана" з кодувальною послідовністю, лігована

таким чином, що експресія кодувальної послідовності досягається в умовах, відповідних послідовностям контролю. "Функціонально пов'язані" послідовності передбачають як послідовності контролю експресії, які є суміжними з геном, що становить інтерес, так і послідовності контролю експресії, які діють у транс-положенні або на відстані зі здійсненням контролю гена, що становить інтерес. Термін "послідовність контролю експресії", використовуваний у даному документі, означає полінуклеотидні послідовності, які є необхідними для здійснення експресії та процесингу кодувальних послідовностей, з якими вони лігovanі. Послідовності контролю експресії передбачають відповідні послідовності ініціації транскрипції, термінації транскрипції, промоторні й енхансерні послідовності; ефективні сигнали процесингу РНК, такі як сигнали сплайсингу та поліаденілювання; послідовності, які стабілізують цитоплазматичну mRNA; послідовності, які підвищують ефективність трансляції (тобто консенсусна послідовність Kozak); послідовності, які підвищують стабільність білка; і за потреби послідовності, які підсилюють секрецію білка. Природа таких послідовностей контролю відрізняється залежно від організму-хазяїна; у прокаріотів такі послідовності контролю, як правило, включають промотор, сайт зв'язування рибосоми і послідовність термінації транскрипції; в еукаріотів, як правило, такі послідовності контролю включають промотори і послідовність термінації транскрипції. Мається на увазі, що термін "послідовності контролю" включає компоненти, наявність яких необхідна для експресії та процесингу, а також може включати додаткові компоненти, наявність яких є сприятливою, наприклад лідерні послідовності і послідовності партнера із злиття. Білкові конструкції за даним винаходом можуть бути експресовані та очищені із застосуванням векторів експресії і клітин-хазяїнів, відомих із рівня техніки, у тому числі касет експресії, векторів, рекомбінантних клітин-хазяїнів і способів рекомбінантної експресії та протеолітичного процесингу рекомбінантних поліпротеїнів і білків-попередників з єдиної відкритої рамки зчитування (наприклад, WO 2007/014162, включена в даний документ за допомогою посилання).

Термін "трансформація", як визначено у даному документі, означає будь-який процес, за допомогою якого екзогенна ДНК потрапляє в клітину-хазяїна. Трансформація може відбуватися в природних або штучних умовах із застосуванням різних способів, добре відомих із рівня техніки. Трансформація може базуватися на будь-якому відомому способі вставлення чужорідних послідовностей нуклеїнової кислоти у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна. Спосіб вибирають з урахуванням того, яка клітина-хазяїн піддається трансформації, і він може включати без обмежень вірусну інфекцію, електропорацію, ліпофекцію та бомбардування частинками. Ці "трансформовані" клітини передбачають стабільно трансформовані клітини, в яких вставлена ДНК здатна реплікуватися або як плазміда, що реплікується автономно, або як частина хромосоми хазяїна. Вони також передбачають клітини, які тимчасово експресують вставлену ДНК або РНК протягом обмежених періодів часу.

Мається на увазі, що термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн"), використовуваний у даному документі, означає клітину, в яку була введена екзогенна ДНК. Слід розуміти, що такі терміни передбачаються для позначення не лише конкретної клітини, що піддавалася впливу, але і потомства такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть відбуватися певні модифікації, зумовлені або мутаціями, або впливами навколишнього середовища, таке потомство практично може не бути ідентичним вихідній клітині, але воно все-таки включається в обсяг терміна "клітина-хазяїн", використовуваного в даному документі. Переважно клітини-хазяїни передбачають прокаріотичні й еукаріотичні клітини, вибрані з будь-якого із царств живої природи. Переважні еукаріотичні клітини передбачають клітини представників найпростіших, грибів, рослин і тварин. Найбільш переважно клітини-хазяїни включають без обмежень лінію прокаріотичних клітин *E. coli*; лінії клітин ссавця CHO, HEK 293 і COS; лінію клітин комах *Sf9* та клітини гриба *Saccharomyces cerevisiae*.

Стандартні методики можуть застосовуватися для роботи з рекомбінантною ДНК, синтезу олігонуклеотидів, а також культури тканин і трансформації (наприклад, електропорація, ліпофекція). Ферментативні реакції і методики очищення можна проводити згідно з інструкціями виробника, або як зазвичай здійснюється в даній галузі техніки, або як описано у даному документі. Вищезгадані методики та процедури можна загалом проводити згідно з традиційними способами, добре відомими з рівня техніки, і як описано в різних загальних і більш спеціальних бібліографічних посиланнях, які процитовані і обговорюються у всьому даному описі. Див., наприклад, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), який включено в даний документ за допомогою посилання для будь-яких цілей.

Термін "трансгенний організм", відомий із рівня техніки і використовуваний у даному документі, означає організм, що має клітини, які містять трансгени, при цьому трансген,

введений в організм (або в предка організму), експресує поліпептид, що не експресується в організмі природним чином. Термін "трансген" являє собою конструкцію ДНК, яка стабільно і функціонально інтегрована в геном клітини, з якої розвивається трансгенний організм, при цьому керує експресією закодованого продукту гена в одному або декількох типах клітин або тканин трансгенного організму.

Терміни "регулювати" та "модулювати" використовуються взаємозамінно та використовуються в даному документі для позначення зміни або альтерації активності молекули, що становить інтерес (наприклад, біологічної активності hCD40). Модуляція може являти собою підвищення або зниження сили певної активності або функції молекули, що становить інтерес. Ілюстративні види активності та функцій молекули включають без обмежень характеристики зв'язування, ферментативну активність, активацію клітинних рецепторів і сигнальну трансдукцію.

Відповідно, термін "модулятор", використовуваний у даному документі, являє собою сполуку, яка здатна до зміни або альтерації активності або функції молекули, що становить інтерес (наприклад, біологічної активності hCD40). Наприклад, модулятор може підвищувати або знижувати силу певної активності або функції молекули порівняно із силою активності або функції, що спостерігається за відсутності модулятора. У певних випадках здійснення модулятор являє собою інгібітор, який знижує силу щонайменше однієї активності або функції молекули. Ілюстративні інгібітори включають у себе без обмежень білки, пептиди, антитіла, пептидні антитіла, вуглеводи або невеликі органічні молекули. Пептидні антитіла описані, наприклад, у WO 01/83525.

Термін "ефективна кількість", використовуваний у даному документі, означає кількість терапевтичного засобу, яка є достатньою для зниження або полегшення важкості та/або періоду перебігу порушення або одного, або декількох його симптомів, запобігання прогресуванню порушення, забезпечення зворотного розвитку порушення, запобігання рецидиву, розвитку, прояву або прогресування одного або декількох симптомів, пов'язаних із порушенням, виявлення порушення або підсилення або покращення профілактичного або терапевтичного ефекту(-ів) іншої терапії (наприклад, профілактичного або терапевтичного засобу).

Термін "пацієнт із відсутністю клінічної відповіді", використовуваний у даному документі, застосовують для позначення суб'єкта з IBD (наприклад, хворобою Крона або виразковим колітом), у якого відсутнє покращення або спостерігалось обмежене або недостатнє покращення статусу його клінічного захворювання після лікування за допомогою інгібітора TNF α (наприклад, відсутність зниження бала CDAI, відсутність зниження у застосуванні кортикостероїдів). В одному варіанті здійснення пацієнт із відсутністю клінічної відповіді під час терапії, спрямованої на TNF, є суб'єктом з IBD, у якого не досягається зниження наявного в нього бала індексу активності хвороби Крона (CAI) на 100 пунктів або більше після лікування за допомогою інгібітора TNF α . В одному варіанті здійснення пацієнт із відсутністю клінічної відповіді під час терапії є суб'єктом з IBD, у якого не досягається зниження наявного в нього бала індексу активності хвороби Крона (CAI) на 100 пунктів або більше протягом конкретного інтервалу часу після лікування за допомогою інгібітора TNF α .

I. Антитіла, які зв'язують CD40 людини (hCD40)

В одному аспекті даного винаходу передбачені гуманізовані антитіла-антагоністи або їхні антиген-зв'язувальні частини, які зв'язують CD40, у тому числі CD40 людини (hCD40). Інші варіанти здійснення даного винаходу включають моноклональні антитіла мишачих або їхні антиген-зв'язувальні частини, які зв'язуються з CD40, а також химерні антитіла, що містять варіабельні ділянки мишачих антитіл до CD40, описаних у даному документі. Переважно антитіла за даним винаходом являють собою антитіла-антагоністи до CD40 (наприклад, до CD40 людини), що не проявляють значної агоністичної активності.

1. Гуманізовані антитіла-антагоністи до hCD40, що походять з антитіла 1 (Ab1)

Даний винахід, принаймні частково, базується на ідентифікації гуманізованих антитіл до CD40, що мають антагоністичні характеристики, і в певних варіантах здійснення не проявляють значної агоністичної активності.

Як описано у прикладі 1, були ідентифіковані три мишачих антитіла-антагоністи до hCD40, тобто Ab1 (послідовність VL-ділянки описана під SEQ ID NO: 9, а послідовність VH-ділянки описана під SEQ ID NO: 5), Ab2 (послідовність VL-ділянки описана під SEQ ID NO: 76, а послідовність VH-ділянки описана під SEQ ID NO: 75) і Ab3 (послідовність VL-ділянки описана під SEQ ID NO: 48, а послідовність VH-ділянки описана під SEQ ID NO: 44).

Консенсусні послідовності CDR визначали на основі вирівнювань амінокислотних послідовностей CDR мишачих антитіл-антагоністів Ab1, Ab2 і Ab3. Консенсусні амінокислотні послідовності для CDR1, CDR2 і CDR3 VH-ділянок описані відповідно під SEQ ID NO 78, 79 і 80,

а консенсусні амінокислотні послідовності для амінокислотних послідовностей CDR1, CDR2 і CDR3 VL-ділянок описані відповідно під SEQ ID NO 108, 109 і 110. Усі послідовності також описані нижче у таблиці 5 і на фігурі 4.

Таблиця 5

Вирівнювання амінокислотних послідовностей CDR гібридомних антитіл до CD40

	Гібридомне антитіло	CDR1	CDR2	CDR3
Важкий ланцюг (SEQ ID NO 45-47, 6-8, 6, 42, 8 і 78-80 відповідно в порядку появи)	Ab3	GYTFTSYTMH	YINPSSDYPNYNQKFKD	WGYSFDY
	Ab1	GFTFSDYGMN	YISSGRSNIYYADTVKG	SWG YFDV
	Ab2	GFTFSDYGMN	YISSGRGNIYYADTVKG	SWG YFDV
	Консенсусна послідовність	GFTFSDYGMN Y T S T H	YISSGR NIYYADTVKG NPSS YPN NQKF D	SWG YFDV WGYS
Легкий ланцюг (SEQ ID NO 49-51, 10-12, 10-12 і 108-110 відповідно в порядку появи)	Ab3	RSSKSLLS-NGNTYLY	RMSTLAS	MQHLEYPLT
	Ab1	KSSQSLLNSGNQKNYLT	WASTRES	QNDYTYPLT
	Ab2	KSSQSLLNSGNQKNYLT	WASTRES	QNDYTYPLT
	Консенсусна послідовність	KSSQSLLNSGNQKNYLT R K H – GNT Y	WASTRES RM LA	QNDYTYPLT MQHLE

5

Консенсусна амінокислотна послідовність CDR1-домену важкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:78 (G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)). Консенсусна амінокислотна послідовність CDR2-домену варіабельної ділянки важкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:79 (YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S) (D/S/G)(N/Y)(I/P) (Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K) (V/F)K(G/D)). Консенсусна амінокислотна послідовність CDR3-домену варіабельної ділянки важкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:80 ((S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV).

10

Консенсусна амінокислотна послідовність CDR1-домену варіабельної ділянки легкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:108 ((K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)). Консенсусна амінокислотна послідовність CDR2-домену варіабельної ділянки легкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:109 ((W/R)(A/M) ST (R/L) (E/A)S). Консенсусна амінокислотна послідовність CDR3-домену варіабельної ділянки легкого ланцюга викладена під SEQ ID NO:110 ((Q/M)(N/Q) (D/H)(Y/L)(T/E)YPLT).

15

В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачене антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що містять варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR1 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 108, CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 109, CDR3 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 110, і що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR1 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 78, CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 79, CDR3 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 80.

20

Після ідентифікації мишачих антитіл Ab1, Ab2 і Ab3 антитіла Ab1 і Ab3 були вибрані для гуманізації (описана нижче у прикладі 2). У таблицях 11 і 12 представлені амінокислотні послідовності CDR, VH- і VL-ділянок гуманізованих Ab1 і Ab3 відповідно. Зокрема, було створено дев'ять різних гуманізованих антитіл на основі Ab3 (див. приклад 2 і таблицю 12 нижче). Також було створено чотири різних гуманізованих антитіла на основі Ab1, у тому числі наступні:

25

А) huAb1VH.1/VL.1 (амінокислотна послідовність VH-ділянки викладена під SEQ ID NO: 13, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 6, 7 і 8; й амінокислотна послідовність VL-ділянки викладена під SEQ ID NO: 14, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 10, 11 і 12);

35

В) huAb1VH.1A/VL.1 (амінокислотна послідовність VH-ділянки викладена під SEQ ID NO: 15, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 6, 7 і 8; й амінокислотна послідовність VL-ділянки викладена під SEQ ID NO: 14, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 10, 11 і 12);

40

С) huAb1VH.1/VL.1A (амінокислотна послідовність VH-ділянки викладена під SEQ ID NO: 13, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 6, 7 і 8; й амінокислотна послідовність VL-ділянки викладена під SEQ ID NO: 16, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 10, 11 і 12); і

D) huAb1VH.1A/VL.1A (амінокислотна послідовність VH-ділянки викладена під SEQ ID NO: 15, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 6, 7 і 8; амінокислотна послідовність VL-ділянки викладена під SEQ ID NO: 16, і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL-ділянки викладені відповідно під SEQ ID NO: 10, 11 і 12).

Гуманізовані версії Ab1 модифікували додатково, щоб видалити потенційний сайт дезамідування в CDR1 легкого ланцюга. Аналізували шість варіантів антитіл huAb1, і чотири з цих антитіл були ідентифіковані як антагоністи CD40. Шість антитіл позначені в даному документі як Ab1v1, Ab1v2, Ab1v3, Ab1v4, Ab1v5 і Ab1v6 (послідовності CDR і варіабельних ділянок представлені в таблиці 13 нижче). Із шести гуманізованих варіантів Ab1 huAb1v1 було відібрано такий, що характеризується особливо чудовою антагоністичною активністю. Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга huAb1v1 представлена під SEQ ID NO: 15, при цьому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 описані відповідно під SEQ ID NO: 6, 7 і 8. Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга huAb1v1 представлена під SEQ ID NO: 20, при цьому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 описані відповідно під SEQ ID NO: 21, 11 і 12.

CDR2 важкого ланцюга антитіла huAb1v1 піддавали додатковому мутагенезу, що привело до одержання сімнадцяти варіантів (описані нижче в прикладі 4). Ці варіанти CDR2 важкого ланцюга huAb1v1 позначені у даному документі як huAb1v1CDR2v1-huAb1v1CDR2v17. Послідовності важких ланцюгів huAb1v1CDR2v1-huAb1v1CDR2v17 представлені у таблиці 16, з яких VH huAb1v1CDR2v7 був вибраний як клон, що характеризується особливо чудовою антагоністичною активністю щодо CD40, залишаючись при цьому таким, що практично не проявляє агоністичної активності. Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга huAb1v1CDR2v7 представлена під SEQ ID NO: 28, при цьому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 описані відповідно під SEQ ID NO: 6, 42 і 8.

Після відбору VH-ділянки huAb1v1CDR2v7 (VH-ділянка під SEQ ID NO: 28, при цьому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 описані відповідно під SEQ ID NO: 6, 42 і 8) і VL-ділянки huAb1v1 (VL-ділянка під SEQ ID NO: 20, при цьому послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 описані відповідно під SEQ ID NO: 21, 11 і 12) варіабельні ділянки клонували у дві різні IgG-основи, що привело до одержання двох антитіл-антагоністів до CD40, тобто Ab101 і Ab102. У таблиці 6 (і таблиці 19) представлені послідовності повнорозмірних важкого ланцюга і легкого ланцюга для конкретних варіантів здійснення даного винаходу, що належать до цих IgG-антитіл. У таблиці 6 константні ділянки підкреслені, а CDR-домени виділені жирним шрифтом.

ТАБЛИЦЯ 6

Гуманізовані антитіла до CD40, Ab101 і Ab102, а також послідовності їхнього важкого і легкого ланцюгів

Анти-тіло	Послідовність важкого ланцюга	HC SEQ ID NO:	Послідовність легкого ланцюга	LC SEQ ID NO:
Ab101	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGF TFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAISSG RGNIIYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	39	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLRGNQKNYLTWFQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	40

Анти-тіло	Послідовність важкого ланцюга	HC SEQ ID NO:	Послідовність легкого ланцюга	LC SEQ ID NO:
Ab102	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYSSGRNIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHNHYTQKLSLSPPGK	41	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLRGNQKNYLTWFQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYTYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40

Відповідно, в одному варіанті здійснення даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40, що містить легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:40, і важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: NO:39 (Ab101). В альтернативному варіанті здійснення даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40, що містить легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:40, і важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: NO:41 (Ab102).

Таким чином, даний винахід передбачає мишачі, химерні і гуманізовані антитіла до CD40, що мають антагоністичну активність. У певних варіантах здійснення даного винаходу передбачені антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що включають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12, та/або варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8. У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають CDR1 важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:6, CDR2 важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:42, CDR3 важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:8, CDR1 легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:21, CDR2 легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:11, і CDR3 легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:12. У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельний домен важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 28, і варіабельний домен легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 20. В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 41; і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 40. В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 39; і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 40.

Антитіла з амінокислотними послідовностями (варіабельної ділянки або CDR) описані у таблицях 5, 6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 і 19, включених у даний винахід. Відповідно, в одному аспекті даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, що мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить (а) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 10, 17, 19 або 21; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12. Як альтернатива або в поєднанні, антитіло-

ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 9.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 13, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає

5 амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:14, 16 або 18.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 15, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає

10 амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:14, 16, 18, 20 або 43.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 28, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає

амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 20.

Антитіла, описані у даному документі, зокрема антитіло Ab102, проявляють антагоністичну активність без значної агоністичної активності щодо CD40. Таким чином, у даний винахід включені антитіла, які зв'язуються з епітопом, що розпізнається антитілами Ab102 і Ab101. У конкретному варіанті здійснення даний винахід включає виділене антитіло або його антиген-зв'язувальну частину, де вказане антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент зв'язують CD40 людини таким чином, що після зв'язування указаним антитілом або його антиген-зв'язувальним фрагментом епітопу, що визначається топографічними ділянками Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 і Thr24-Cys37 із SEQ ID NO:1, пригнічується зв'язування CD40 з лігандом CD40 (CD40L). В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента, здатних зв'язувати CD40 людини, причому вони зв'язуються з епітопом на CD40 людини, що містить три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десяти, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять, п'ятнадцять, шістнадцять, сімнадцять, вісімнадцять, дев'ятнадцять, двадцять, двадцять один, двадцять два, двадцять три, двадцять чотири, двадцять п'ять, двадцять шість, двадцять сім, двадцять вісім, двадцять дев'ять, тридцять, тридцять один, тридцять два, тридцять три, тридцять чотири або всі амінокислотні залишки Cys62-Phe67 (Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66, Phe67), Gln79-Cys83 (Gln79, His 80, Lys81, Tyr82, Cys83), Arg90-Thr99 (Arg90, Val91, Gln92, Gln93, Lys94, Gly95, Thr96, Ser97, Glu98 і Thr99) і Thr24-Cys37 (Thr24, Ala25, Cys26, Arg27, Glu28, Lys29, Gln30, Tyr31, Leu32, Ile33, Asn34, Ser35, Gln36, Cys37) із SEQ ID NO:1.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу передбачена CDR2-ділянка важкого ланцюга з антагоністичною активністю щодо CD40. Зокрема, залишок 55 (залишок X) з амінокислотної послідовності CDR2 VH-ділянки, YISSGRXNIYYADTVKG (SEQ ID NO: 112), був ідентифікований як такий, що відіграє важливу роль у посиленні антагоністичної активності антитіла щодо вихідної послідовності CDR2 із залишком S55. Залишки Thr, Asp, Val, Ile і Met у положенні 55 CDR2 HC приводять до більш низьких рівнів антагоністичної активності порівняно з іншими амінокислотами в положенні 55. В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачено антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 111, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR2 з амінокислотною послідовністю під SEQ ID NO: 11. Амінокислотні послідовності CDR1- і CDR3-доменів, які можуть бути об'єднані із SEQ ID NO: 111 у рамках варіабельної ділянки важкого і легкого ланцюгів антитіла, описані у всьому даному документі, у тому числі, наприклад, у таблицях 13 і 18.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу передбачена CDR1-ділянка легкого ланцюга із залишком, ідентифікованим як перемикач антагоністичної/агоністичної активностей. Як описано нижче у прикладі 3, модифікація мотиву "NS" CDR1 VL-ділянки, KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10), у залишку "S" може призводити до перетворення антитіла-антагоніста в антитіло-агоніст. Таким чином, в одному варіанті здійснення даний винахід передбачає антитіло-антагоніст до CD40 з CDR1 VL-ділянки, яка містить SEQ ID NO: 113 (KSSQSLLNXGNQKNYLT; де X не являє собою амінокислотний залишок Pro).

Термін "конкуруючі антитіла" в даному документі означає будь-яке число антитіл, що націлюються на один і той же молекулярний або стабільний, але не зв'язаний ковалентними зв'язками надмолекулярний об'єкт, переважно на одну і ту ж молекулу, тобто CD40, при цьому щонайменше одне з антитіл здатне специфічно знижувати вимірюване зв'язування іншого антитіла, переважно шляхом стеричного ускладнення доступу іншого антитіла до свого цільового епітопу (описано вище) або шляхом індукування та/або стабілізації конформації цільового об'єкта, що знижує афінність цільового об'єкта щодо іншого антитіла, більш переважно шляхом безпосереднього блокування доступу до епітопу-мішені іншого антитіла

шляхом зв'язування з епітопом, який розташований у безпосередній близькості від першого, який перекривається з першим або ідентичний першому, найбільш переважно такий, що перекривається або ідентичний, зокрема ідентичний. У даному документі йдеться про те, що два епітопи є "такими, що перекриваються", якщо частина їхніх хімічних структур, переважно їхніх амінокислотних послідовностей, є спільною, і є "ідентичними", якщо їхні хімічні структури, переважно їхні амінокислотні послідовності, ідентичні.

У конкретних варіантах здійснення конкуруюче антитіло або його антиген-зв'язувальна частина являють собою антитіло або його антиген-зв'язувальну частину, які конкурують із будь-яким з антитіл, представлених у даному документі. В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачено конкуруюче антитіло, яке може конкурувати з антитілами, описаними у даному документі (наприклад, Ab101 або Ab102), і зв'язується з топографічним епітопом CD40 людини, що включає залишки Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 і Thr24-Cys37.

У конкретних варіантах здійснення антитіло-агоніст містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 7; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8; і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 74; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12.

В інших конкретних варіантах здійснення антитіло-агоніст містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 7; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8; і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 17; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12.

У додаткових варіантах здійснення антитіло-агоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 15 або 13; та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 77 або 43.

2. Гуманізовані антитіла до CD40, що походять із антитіла 3 (Ab3)

Амінокислотні послідовності для гуманізованих версій важкого і легкого ланцюгів мишачого Ab3 представлені в таблиці 11 нижче. Таким чином, у даному винаході додатково представлені антитіла, що містять послідовності варіабельної ділянки та/або CDR з антитіла 3 (Ab3).

В одному аспекті даного винаходу передбачено гуманізоване антитіло або його антиген-зв'язувальна частина, що включають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:49; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 50; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 51; і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 46; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 47.

Відповідно, в одному аспекті даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, що мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:49; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 50; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 51. Як альтернатива або в поєднанні, антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 46; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 47.

У ще одному аспекті даного винаходу антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 44, 52, 54 або 55; та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 48, 53, 56 або 57.

У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 44, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 48.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна

частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 52, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:53, 56 або 57.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 54, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:53, 56 або 57.

В іншому варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO: 55, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:53, 56 або 57.

3. Химерні антитіла до CD40

Химерне антитіло являє собою молекулу, в якій різні частини антитіла походять від різних видів тварин, як наприклад антитіла з варіабельною ділянкою, що походить з мишачого моноклонального антитіла, і константною ділянкою імуноглобуліну людини. Способи одержання химерних антитіл відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; патенти США №№ 5807715; 4816567 і 4816397, які включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Крім того, можна застосовувати методики, розроблені для одержання "химерних антитіл" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454, кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті), які полягають у сплайсингу генів молекули антитіла миші з відповідною антигенною специфічністю, разом із генами молекули антитіла людини з відповідною біологічною активністю.

В іншому аспекті даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, що мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:10; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12; і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 42; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8. У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:76, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:75.

В іншому аспекті даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, що мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:49; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 50; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 51; і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 45; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 46; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 47. У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:48, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:44.

В іншому аспекті даний винахід спрямований на антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину, що мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO:10; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 11; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 12; і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає (a) CDR1 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 6; (b) CDR2 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 7; і (c) CDR3 з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 8. У конкретному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина мають варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:9, і варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, викладену під SEQ ID NO:5.

Вищенаведені послідовності CDR виділеного антитіла до CD40 створюють нову родину

антитіл до CD40 або їх антиген-зв'язувальних частин, що виділяються згідно з даним винаходом і включають антитіла, які містять послідовності CDR, перелічені в таблицях 5, 11-13 і 15-18. Для одержання і відбору CDR за даним винаходом, що характеризуються переважним зв'язуванням CD40 та/або нейтралізуючою активністю щодо hCD40, можна застосовувати стандартні

5 способи, відомі з рівня техніки, які служать для одержання антитіл за даним винаходом і оцінки характеристик зв'язування та/або нейтралізації CD40 у цих антитіл, у тому числі без обмеження спеціально описані в даному документі.

4. Визначення характеристик антитіл за даним винаходом

Антитіла до CD40 за даним винаходом являють собою антитіла-антагоністи, і вони можуть характеризуватися високою продуктивністю у зниженні або нейтралізації активності CD40, наприклад, як оцінюється за допомогою будь-якого з ряду *in vitro* та *in vivo* аналізів, відомих із рівня техніки й описуваних у даному документі. У певних варіантах здійснення антитіла до CD40 за даним винаходом є антагоністами і практично не проявляють агоністичної активності. Антагоністичну й агоністичну активності можна визначати за допомогою аналізів, відомих із

10 рівня техніки, у тому числі аналізів, описаних у даному документі. Наприклад, зв'язування з CD40 людини і пригнічування взаємодії CD40-CD40L можна проаналізувати із застосуванням лінії клітин, що експресують CD40 людини, за допомогою FACS-аналізів.

В одному варіанті здійснення антагоністичну або агоністичну активності щодо CD40 у антитіла до CD40 визначають із застосуванням лінії клітин із геном-репортером. Наприклад, антагоністичну і агоністичну активності можна оцінювати із застосуванням лінії клітин, що експресує CD40, із геном-репортером, яка експресує CD40 людини, зв'язаний із NFκB-активованою лужною фосфатазою (AP). Якщо сигнал одержано завдяки CD40, то активація NFκB приводить до секреції AP, яку вимірюють за допомогою колориметричного субстрату. Як ілюстративний аналіз на антагоністичну активність лінію клітин з геном-репортером для виявлення CD40 можна культивувати або з лінією клітин Jurkat, що експресують CD40L (для забезпечення фізіологічної взаємодії з лігандом), або з розчинним CD40L, при цьому можна оцінювати здатність антитіла до CD40 блокувати сигнал за участю NFκB (від малих кількостей до відсутності AP, як визначено за допомогою стандартних способів). Як ілюстративний аналіз на агоністичну активність лінію клітин з геном-репортером для виявлення CD40 людини можна

20 обробляти за допомогою антитіл до CD40 і вимірювати сигнал за участю NFκB (спостережуваний як присутність рівня AP вище негативного контролю), як описано вище. Прикладом лінії клітин із геном-репортером для виявлення CD40 є клітини HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen), які використовують для вимірювання біологічної активності CD40L завдяки секреції ембріональної лужної фосфатази (SEAP) при активації NF-κB після стимуляції CD40. Взаємодію CD40L-CD40 можна відстежувати шляхом оцінки рівнів SEAP із застосуванням QUANTI-Blue (InvivoGen).

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальний фрагмент за даним винаходом характеризуються IC50, що становить 0,4 нМ або менше, як визначено за допомогою аналізу на антагоністичну активність із геном-репортером для виявлення розчинного CD40L. В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальний фрагмент за даним винаходом характеризуються IC50, що становить 51 нМ або менше, як визначено за допомогою аналізу на антагоністичну активність із геном-репортером для виявлення CD40 на клітинах лінії Jurkat. В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальний фрагмент за даним винаходом характеризуються IC50, що становить 3,4 нМ або менше, як визначено за допомогою аналізу на антагоністичну активність із геном-репортером для виявлення CD40 на клітинах лінії Jurkat. В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальний фрагмент за даним винаходом характеризуються IC50, що становить 0,9 нМ або менше, як визначено за допомогою аналізу на антагоністичну активність із геном-репортером для

45 виявлення CD40 на клітинах лінії Jurkat.

В одному варіанті здійснення антагоністичну або агоністичну активності щодо CD40 у антитіла до CD40 визначають за допомогою аналізу на агоністичну активність із застосуванням В-клітин. Наприклад, перед додаванням антитіла-антагоніста до CD40 можна використовувати аналіз на агоністичну активність із застосуванням В-клітин, за якого В-клітини активують за допомогою низької дози антитіла до IgM і IL4. Посилення активації В-клітин можна вимірювати як підвищення рівня CD86, що, зі свого боку, вказує на агоністичну активність. Аналогічно можна використовувати аналіз на антагоністичну активність із застосуванням В-клітин, в якому первинні В-клітини людини культивують із лінією Т-клітин людини, яка експресує CD40L, що призводить до активації В-клітин і підвищення рівня експресії CD86 внаслідок взаємодії CD40/CD40L. Пригнічування підвищення рівня CD86 у первинних В-клітинах людини вказує на

50

антагоністичну активність.

В одному варіанті здійснення антагоністичну і агоністичну активності щодо CD40 у антитіла до CD40 визначають із застосуванням аналізу на основі антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC). Антагоністичну і агоністичну активності можна оцінювати за здатністю антитіла опосередковувати ADCC. Антитіло-антагоніст до CD40 буде ефективно опосередковувати ADCC, тоді як антитіло-агоніст не буде призводити до ADCC-активності. Антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC) називають тип цитотоксичності, індукований активацією макрофагів, NK-клітин, нейтрофілів тощо, який розпізнає клітини-мішені шляхом зв'язування з константною ділянкою антитіла через Fc-рецептори, експресовані на їх поверхні. Комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) називають тип цитотоксичності, індукований активацією системи комплементу, який відбувається завдяки зв'язуванню антитіла з антигеном. Зниження активності ADCC і CDC означає зниження такої активності порівняно, наприклад, із контрольним антитілом-антагоністом до CD40, таким як моноклональне антитіло, що виробляється гібридомом 4D11 (№ доступу FERM BP-7758). У EP 1707627 B1, включеному у даний документ за допомогою посилання у повному своєму обсязі, описані аналізи для визначення активності ADCC і CDC.

Крім того, для аналізу агоністичної активності можна застосовувати оцінку біологічної активності дендритних клітин (DC), простимульованих за допомогою іммобілізованого Ab до CD40. Вважається, що DC являють собою найбільш сильні антиген-презентуючі клітини, здатні відбирати Ag у нелімфоїдних тканин і переносити їх у вторинні лімфоїдні органи для праймування Т-клітин у відповідь на стимули дозрівання, такі як сигнали небезпеки і хелперні сигнали. Навпаки, презентація Ag за допомогою DC без активації приводить до елімінації ефекторних Т-клітин, які мають когнатний TCR, або індукції регуляторних Т-клітин у вторинних лімфоїдних тканинах. Таким чином, присутність або відсутність сигналів дозрівання для незрілих DC у периферичних тканинах діє як перемикач для індукції або адаптивної імунної відповіді, або толерантності. Головний хелперний сигнал від CD4+Т-клітин для дозрівання DC забезпечується при взаємодії між CD40, експресованим на DC, і лігандом CD40 (L) на активованих CD4+Т-клітинах. Таким чином, стимуляція CD40 індукує міграцію DC у вторинні лімфоїдні тканини шляхом підвищувальної регуляції експресії CCR7. У Watanabe et al. 2003 J Immunol; 171:5828-5836 описані аналізи, які можна застосовувати для визначення того, чи можуть антитіла до CD40 активувати DC, щоб визначити їх агоністичну і антагоністичну активності. Ці ілюстративні аналізи передбачають визначення експресії Ag MHC I/II класу і коstimулюючих молекул на BM-DC, простимульованих за допомогою іммобілізованого Ab до CD40, активності in vivo міграції BM-DC, простимульованих за допомогою іммобілізованого Ab до CD40, активності in vitro міграції та експресії CCR7 у BM-DC, простимульованих за допомогою іммобілізованого Ab до CD40.

В одному варіанті здійснення агоністичну активність антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини визначають за допомогою in vitro аналізу активації моноцитів, такого як аналіз, описаний нижче у прикладі 7. In vitro аналіз активації моноцитів передбачає вплив на моноцити антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальної частини, при цьому якщо антитіло або його антиген-зв'язувальна частина є активаторами CD40 (агоністами), то відбувається підвищення вироблення TNF. У разі застосування in vitro аналізу активації моноцитів антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, які практично не проявляють агоністичної активності, будуть призводити до відсутності або мінімального вироблення TNF, як описано у прикладі 7.

В одному варіанті здійснення антитіло-антагоніст до CD40 або його антиген-зв'язувальна частина, які практично не проявляють агоністичної активності, характеризуються активністю, яка знаходиться в межах одного стандартного відхилення від негативного контролю в in vitro аналізі на агоністичну активність щодо CD40, наприклад аналізі на агоністичну активність із застосуванням моноцитів, описаному у прикладі 7.

Аналізи на агоністичну активність додатково описані в US 5786456, US 2011/0243932 і EP 1707627 B1, кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання в повному своєму обсязі. Аналізи на антагоністичну активність для тестування функції антитіла додатково описані в US 7361345, US 2011/0243932 і EP 1707627 B1, кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання.

У переважних варіантах здійснення виділене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина зв'язують CD40 людини, при цьому антитіло або його антиген-зв'язувальна частина дисоціюють від CD40 людини з константою швидкості K_{off} , що становить приблизно $0,1 \text{ s}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або вони пригнічують активність CD40 людини з IC_{50} , яка становить приблизно $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ або менше. Як

альтернатива, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від CD40 людини з константою швидкості k_{off} , що становить приблизно $1 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть пригнічувати активність CD40 людини з IC_{50} , що становить приблизно $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ або менше. Як альтернатива, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від CD40 людини з константою швидкості k_{off} , що становить приблизно $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть пригнічувати CD40 людини з IC_{50} , що становить приблизно $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ або менше. Як альтернатива, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від CD40 людини з константою швидкості k_{off} , що становить приблизно $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть пригнічувати активність CD40 з IC_{50} , що становить приблизно $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ або менше. Як альтернатива, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від CD40 людини з константою швидкості k_{off} , що становить приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть пригнічувати CD40 з IC_{50} , що становить приблизно $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ або менше. Як альтернатива, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від CD40 людини з константою швидкості k_{off} , що становить приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше, як визначено за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть пригнічувати активність CD40 з IC_{50} , що становить приблизно $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ або менше.

Антитіла гуманізували, як описано в прикладах нижче. Зворотні мутації каркасної ділянки вводили в послідовності CDR-прищепленого антитіла за допомогою *de novo* синтезу варіабельного домену або за допомогою мутагенних олігонуклеотидних праймерів і полімеразної ланцюгової реакції, або за допомогою обох способів, забезпечуючи одержання різних комбінацій зворотних мутацій та інших мутацій в кожному з CDR-графтів. Гуманізовані варіабельні ділянки мишачих моноклональних антитіл до CD40 клонували у вектори експресії IgG для визначення функціональних характеристик.

У певних варіантах здійснення антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга, таку як константна ділянка IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD. Переважно, константна ділянка важкого ланцюга являє собою константну ділянку важкого ланцюга IgG1 або константну ділянку важкого ланцюга IgG4. До того ж, антитіло може містити константну ділянку легкого ланцюга, або константну ділянку легкого каппа-ланцюга, або константну ділянку легкого лямбда-ланцюга. Переважно, антитіло містить константну ділянку легкого каппа-ланцюга. Як альтернатива, частина антитіла може являти собою, наприклад, Fab-фрагмент або одноланцюговий Fv-фрагмент.

5. Створення гуманізованих антитіл до CD40

Як описано вище, гуманізовані антитіла являють собою молекули антитіла одержані із застосуванням антитіла від виду, відмінного від людини, яке зв'язує потрібний антиген, і вони мають одну або декілька ділянок, що визначають комплементарність (CDR), з антитіла від виду, відмінного від людини, і каркасні ділянки з молекули імунoglobуліну людини. Відомі послідовності Ig людини розкриті, наприклад, у [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr

roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), кожний включений у даний документ за допомогою посилання в повному обсязі. Ці імпортовані послідовності можна застосовувати для зниження імуногенності або зниження, підсилення або модифікування зв'язування афінності, швидкості асоціації, швидкості дисоціації, авідності, специфічності, часу напіввиведення або будь-яких інших відповідних характеристик, відомих із рівня техніки.

Залишки каркасної ділянки в каркасних ділянках людини можуть бути замінені на відповідний залишок із CDR-донорного антитіла для зміни, переважно підсилення, зв'язування антигена. Ці заміни в каркасній ділянці ідентифікують за допомогою способів, добре відомих із рівня техніки, наприклад за допомогою моделювання взаємодії CDR і залишків каркасної ділянки, щоб ідентифікувати залишки каркасної ділянки, важливі для зв'язування антигена, і шляхом порівняння послідовностей, щоб ідентифікувати незвичайні залишки каркасної ділянки в конкретних положеннях. (Див., наприклад, Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), які включені у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті). Загальнодоступними є тривимірні моделі імуноглобулінів, і вони добре відомі фахівцям у даній галузі. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі структури тривимірної конформації вибраних послідовностей кандидатних імуноглобулінів. Перегляд цих відображень забезпечує аналіз можливої ролі залишків у функціонуванні послідовності кандидатного імуноглобуліну, тобто аналіз залишків, які впливають на здатність кандидатного імуноглобуліну зв'язувати його антиген. Таким чином, FR-залишки можна відбирати з консенсусної та імпортованої послідовностей і комбінувати, щоб досягти потрібної характеристики антитіла, такої як підвищена афінність щодо антигена(-ів) мішені(-ей). Як правило, CDR-залишки безпосередньо і найбільш істотно залучені у вплив на зв'язування антигена. Антитіла можна гуманізувати із застосуванням цілого ряду методик, відомих із рівня техніки, таких як без обмеження описані в Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); публікації PCT WO 91/09967, PCT/: US 98/16280, US 96/18978, US 91/09630, US 91/05939, US 94/01234, GB 89/01334, GB 91/01134, GB 92/01755; WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, EP 229246, EP 592106; EP 519596, EP 239400, патенти США №№ 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, кожний включено в даний документ за допомогою посилання в повному обсязі, у тому числі бібліографічні посилання, процитовані в них.

Приклади гуманізованих антитіл до CD40 представлені в розділах 1 і 2 вище і в прикладах нижче.

II. Вироблення антитіл і лінії антитілоутворюючих клітин

Антитіла за даним винаходом можна одержати за допомогою будь-якої з ряду методик, відомих із рівня техніки.

1. Одержання моноклональних антитіл до CD40 із застосуванням гібридомної технології

Моноклональні антитіла можна одержувати із застосуванням широкого спектра методик, відомих із рівня техніки, у тому числі застосування гібридомної технології, рекомбінантної технології і технології фагового дисплея або їх комбінації. Наприклад, моноклональні антитіла можна одержувати за допомогою методик із застосуванням гібридом, в тому числі відомих із рівня техніки і викладених, наприклад, у Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., у: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (вказані бібліографічні посилання включені за допомогою посилання у всій їх повноті). Термін "моноклональне антитіло", використовуваний у даному документі, не обмежується антитілами, одержаними завдяки гібридомній технології. Термін "моноклональне антитіло" означає антитіло, яке походить від одного клону, в тому числі клону еукаріотичних, прокаріотичних клітин або фагів, і не позначає спосіб, за допомогою якого його одержують.

Способи одержання і скринінгу щодо специфічних антитіл із застосуванням гібридомної технології є стандартними і добре відомі з рівня техніки. В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачені способи одержання моноклональних антитіл, а також антитіла, одержані за допомогою такого способу, які передбачають культивування гібридомної клітини, що секретує антитіло за даним винаходом, при цьому гібридому переважно одержують шляхом злиття спленоцитів, виділених з миші, імунізованої за допомогою антигена за даним винаходом, з мієломними клітинами; і потім скринінг гібридом, одержаних у результаті злиття, щодо клонів

гібридом, котрі секретують антитіло, яке може зв'язати поліпептид за даним винаходом (див. приклад 1). Коротко, мишей можна імунізувати за допомогою антигена CD40. У переважному варіанті здійснення антиген CD40 вводять з ад'ювантом для стимулювання імунної відповіді. Такі ад'юванти включають в себе повний або неповний ад'ювант Фрейнда, RIBI (мураміддипептиди) або ISCOM (імуностимулюючі комплекси). Такі ад'юванти можуть захищати поліпептид від швидкого розсіювання шляхом ізоляції його в місцевому депо, або вони можуть містити речовини, які стимулюють у хазяїна секрецію факторів, які є хемотаксичними для макрофагів та інших компонентів імунної системи. Переважно, якщо вводиться поліпептид, то схема імунізації передбачатиме два або більше введення поліпептиду, рознесених протягом декількох тижнів.

Після імунізації тварини за допомогою антигена CD40 від тварини можна одержувати антитіла та/або антитілоутворюючі клітини. Сироватку крові, що містить антитіло до CD40, одержують від тварини шляхом забору крові або умертвіння тварини. Сироватку крові можна застосовувати у тому вигляді, як вона одержана від тварини, із сироватки крові можна одержати фракцію імуноглобулінів або із сироватки крові можна очистити антитіла до CD40. Сироватка крові або імуноглобуліни, одержані цим способом, є поліклональними, тобто характеризуються гетерогенними властивостями.

Як тільки виявлено імунну відповідь, наприклад у сироватці крові миші виявлені антитіла, специфічні щодо антигена CD40, збирають селезінку миші та виділяють спленоцити. Потім спленоцити зливають за допомогою добре відомих методик із будь-якими відповідними мієломними клітинами, наприклад клітинами з лінії клітин SP20, доступної з ATCC. Гібридами відбирають і клонують за допомогою серійного розведення. Потім клони гібридом аналізують за допомогою способів, відомих із рівня техніки щодо клітин, які секретують антитіла, здатні зв'язувати CD40. Асцитну рідину, яка зазвичай містить високі рівні антитіл, можна одержувати шляхом імунізації мишей із позитивними клонами гібридами.

В іншому варіанті здійснення антитілоутворюючі іморталізовані гібридами можна одержувати з імунізованої тварини. Після імунізації тварину умертвляють і В-клітини селезінки зливають з іморталізованими мієломними клітинами, як добре відомо з рівня техніки. Див., наприклад, Harlow and Lane, вище. У переважному варіанті здійснення мієломні клітини не секретують поліпептиди імуноглобуліну (ліній несекреторних клітин). Після злиття і відбору за допомогою антибіотиків гібридами піддають скринінгу із застосуванням CD40 або його частини, або клітини, що експресує CD40. У переважному варіанті здійснення початковий скринінг здійснюють із застосуванням імуноферментного аналізу (ELISA) або радіоімунологічного аналізу (RIA), переважно ELISA. Приклад скринінгу за допомогою ELISA представлений у WO 00/37504, включеного в даний документ за допомогою посилання.

Гібридами, що виробляють антитіло до CD40, відбирають, клонують і піддають додатковому скринінгу щодо потрібних характеристик, у тому числі стійкий ріст гібридами, високий рівень вироблення антитіл і потрібні характеристики антитіл, як додатково обговорюється нижче. Гібридами можна культивувати і розмножувати *in vivo* у сингенних тварин, у тварин, в яких відсутня імунна система, наприклад у "безтимусних мишей", або в культурі клітин *in vitro*. Способи відбору, клонування і розмноження гібридом добре відомі звичайним фахівцям у даній галузі.

У переважному варіанті здійснення гібридами являють собою гібридами мишей, як описано вище. В іншому переважному варіанті здійснення гібридами одержують у виду, відмінного від людини і відмінного від миші, такого як щури, вівці, свині, кози, велика рогата худоба або коні. В іншому варіанті здійснення гібридами являють собою гібридами людини, в яких клітини несекреторної мієломи людини злиті з людською кліткою, що експресує антитіло до CD40.

За допомогою відомих методик можна одержувати фрагменти антитіл, які розпізнають специфічні епітопи. Наприклад, Fab- і F(ab')₂-фрагменти за даним винаходом можна одержувати за допомогою протеолітичного розщеплення молекул імуноглобулінів, із застосуванням ферментів, таких як папаїн (для одержання Fab-фрагментів) або пепсин (для одержання F(ab')₂-фрагментів). F(ab')₂-фрагменти містять варіабельні ділянки, константну ділянку легкого ланцюга і CH₁-домен важкого ланцюга.

2. Одержання моноклональних антитіл до CD40 із застосуванням SLAM

В іншому аспекті винаходу рекомбінантні антитіла одержують з одиночних виділених лімфоцитів із застосуванням процедури, що позначається у рівні техніки як спосіб одержання антитіл із відібраних лімфоцитів (SLAM), що описується у патенті США № 5627052, публікація згідно PCT WO 92/02551 і Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. У даному способі окремі клітини, які секретують антитіла, що становлять інтерес, наприклад лімфоцити, одержані з будь-якої з імунізованих тварин, описаних у розділі 1, піддають скринінгу

із застосуванням антиген-специфічного аналізу гемолітичних бляшок, де антиген CD40, субодиниця CD40 або його фрагмент зв'язують з еритроцитами вівці із застосуванням лінкера, такого як біотин, і застосовують для ідентифікації окремих клітин, які секретують антитіла, що характеризуються специфічністю щодо CD40. Після ідентифікації клітин, які секретують антитіло, що становить інтерес, cDNA варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів витягують з клітин за допомогою ПЛР зі зворотною транскриптазою, і потім ці варіабельні ділянки можна експресувати у зв'язку з відповідними константними ділянками імуноглобуліну (наприклад, константними ділянками людини), у клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавців, таких як клітини COS або CHO. Клітини-хазяїни, трансфіковані за допомогою ампліфікованих послідовностей імуноглобуліну, одержаних із *in vivo* відібраних лімфоцитів, потім можна піддавати додатковому аналізу і відбору *in vitro*, наприклад шляхом пеннінгу трансфікованих клітин для виділення клітин, що експресують антитіла до CD40. Ампліфіковані послідовності імуноглобуліну далі можна обробляти *in vitro*, як наприклад за допомогою *in vitro* способів дозрівання афінності, таких як описані в публікації згідно PCT WO 97/29131 і публікації згідно PCT WO 00/56772.

3. Одержання моноклональних антитіл до CD40 із використанням трансгенних тварин

В іншому варіанті здійснення даного винаходу антитіла одержують шляхом імунізації тварини, відмінної від людини, яка містить деякі або всі локуси імуноглобуліну людини, за допомогою антигена CD40. У переважному варіанті здійснення тварина, відмінна від людини, являє собою трансгенну мишу XENOMOUSE, розроблену лінію мишей, які містять великі фрагменти локусів імуноглобулінів людини і не здатні виробляти антитіла миші. Див., наприклад, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) and United States Patents 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 and 6,130,364. Див. також WO 91/10741, опубліковану 25 липня 1991 року, WO 94/02602, опубліковану 3 лютого 1994 року, WO 96/34096 і WO 96/33735, обидві опубліковані 31 жовтня 1996 року, WO 98/16654, опубліковану 23 квітня 1998 року, WO 98/24893, опубліковану 11 червня 1998 року, WO 98/50433, опубліковану 12 листопада 1998 року, WO 99/45031, опубліковану 10 вересня 1999 року, WO 99/53049, опубліковану 21 жовтня 1999 року, WO 00/09560, опубліковану 24 лютого 2000 року і WO 00/037504, опубліковану 29 червня 2000 року. Трансгенна миша XENOMOUSE продукує репертуар повністю людських антитіл, подібних до антитіл дорослої людини, і виробляє антиген-специфічні Mаб людини. Трансгенна миша XENOMOUSE містить приблизно 80 % репертуару антитіл людини завдяки введенню мегабазних YAC-фрагментів у конфігурації зародкового типу з локусів важкого ланцюга і легкого ланцюга людини. Див. Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), розкриття яких включені за допомогою посилання.

4. Одержання моноклональних антитіл до CD40 із застосуванням бібліотеки рекомбінантних антитіл

In vitro способи також можна застосовувати для одержання антитіл за даним винаходом, при цьому бібліотеку антитіл піддають скринінгу для ідентифікації антитіла з потрібною специфічністю зв'язування. Способи для такого скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл добре відомі з рівня техніки і включають способи, описані, наприклад, у Ladner et al., патент США № 5223409; Kang et al., публікація згідно PCT № WO 92/18619; Dower et al., публікація згідно PCT № WO 91/17271; Winter et al., публікація згідно PCT № WO 92/20791; Markland et al., публікація згідно PCT № WO 92/15679; Breitling et al., публікація згідно PCT № WO 93/01288; McCafferty et al., публікація згідно PCT № WO 92/01047; Garrard et al., публікація згідно PCT № WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; i Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982, публікація заявки на патент США 20030186374 і публікація згідно PCT № WO 97/29131, зміст кожної з яких включено у даний документ за допомогою посилання.

Бібліотека рекомбінантних антитіл може бути одержана від суб'єкта, імунізованого за допомогою CD40 або частини CD40, такої як позаклітинний домен. Як альтернатива, бібліотека рекомбінантних антитіл може бути одержана від суб'єкта, що не піддавався впливу, тобто суб'єкта, який не був імунізований за допомогою CD40, як наприклад бібліотека антитіл людини від суб'єкта-людини, який не був імунізований за допомогою CD40 людини. Антитіла за даним винаходом відібрані за допомогою скринінгу бібліотеки рекомбінантних антитіл за допомогою пептиду, що містить CD40 людини, щоб завдяки цьому відібрати ті антитіла, які розпізнають

CD40. Способи проведення такого скринінгу і відбору добре відомі з рівня техніки, як наприклад описані в бібліографічних посиланнях у попередньому абзаці. Для відбору антитіл за даним винаходом, які характеризуються певними значеннями афінності зв'язування щодо hCD40, таких як антитіла, які дисоціюють від CD40 людини з певною константою швидкості k_{off} , при цьому можна застосовувати спосіб поверхневого плазмонного резонансу, відомий із рівня техніки, щоб відібрати антитіла з потрібною константою швидкості k_{off} . Для відбору антитіл за даним винаходом із певною нейтралізуючою активністю щодо hCD40, таких як антитіла з певною IC_{50} , можна застосовувати стандартні способи, відомі з рівня техніки, які використовуються для оцінки пригнічування активності hCD40.

В одному аспекті даний винахід стосується виділеного антитіла або його антиген-зв'язувальної частини, які зв'язують CD40 людини. Переважно, антитіло являє собою нейтралізуюче антитіло. У різних варіантах здійснення антитіло являє собою рекомбінантне антитіло або моноклональне антитіло.

Наприклад, антитіла за даним винаходом також можна одержувати із застосуванням різних способів фагового дисплея, відомих із рівня техніки. У способах фагового дисплея функціональні домени антитіл представлені на поверхні фагових частинок, які несуть полінуклеотидні послідовності, що кодують їх. Зокрема, такі фаги можна використовувати для представлення антиген-зв'язувальних доменів, експресованих на основі репертуарної або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Фаги, що експресують антиген-зв'язувальний домен, який зв'язує антиген, що становить інтерес, можуть бути відібрані або ідентифіковані за допомогою антигена, наприклад із застосуванням міченого антигена або антигена, зв'язаного з твердою поверхнею або гранулою або захопленого на них. Фаги, що застосовуються в таких способах, як правило, являють собою ниткоподібні фаги, у тому числі fd і M13, що зв'язують домени, які експресуються за рахунок фагів із Fab-, Fv- або стабілізованими дисульфідними зв'язками Fv-доменими антитіла, рекомбінантним чином злитими з одним із гена білка III або гена білка VIII фага. Приклади способів фагового дисплея, які можна застосовувати для одержання антитіл за даним винаходом, включають способи, розкриті в Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); заявці згідно PCT № PCT/GB91/01134; публікаціях згідно PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401 і патентах США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108; кожний із з яких включений у даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті.

Як описано у вищенаведених бібліографічних посиланнях, після відбору фагів, ділянки, які кодують антитіло, можна виділяти з фага і застосовувати для одержання цілих антитіл, у тому числі антитіл людини або будь-якого іншого потрібного антиген-зв'язувального фрагмента, і експресувати в будь-якому потрібному хазяїні, у тому числі клітини ссавця, клітини комахи, клітини рослини, дріжджі і бактерії, наприклад як детально описано нижче. Наприклад, також можна використовувати методики для рекомбінантного одержання Fab-, Fab'- і F(ab')₂-фрагментів із застосуванням способів, відомих із рівня техніки, таких як способи, розкриті в публікації згідно PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); і Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); і Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (вказані бібліографічні посилання включені за допомогою посилання у всій своїй повноті). Приклади методик, які можна застосовувати для одержання одноланцюгових Fv і антитіл, включають методики, описані у патентах США 4946778 і 5258498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); і Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).

Як альтернатива, проведення скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл за допомогою фагового дисплея, інші методики, відомі з рівня техніки, для скринінгу великих комбінаторних бібліотек можна застосовувати для ідентифікації антитіл із подвійною специфічністю за даним винаходом. Одним типом альтернативної системи експресії є така, в якій бібліотека рекомбінантних антитіл експресується у вигляді злиттів PHK-білок, як описано в публікації згідно PCT № WO 98/31700 від Szostak і Roberts, і в Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302. У цій системі створюють ковалентне злиття між mRNA і пептидом або білком, які вона кодує, шляхом *in vitro* трансляції синтетичних mRNA, які несуть на своєму 3'-кінці пуроміцин, пептидил-акцепторний антибіотик. При цьому вміст специфічної mRNA в складній суміші mRNA (наприклад, комбінаторної бібліотеки) можна підвищувати за рахунок властивостей закодованого пептиду або білка, наприклад антитіла або його частини, як наприклад шляхом зв'язування антитіла або його частини з антигеном із подвійною специфічністю. Послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіла або їх частини,

вилучені після скринінгу таких бібліотек, можна експресувати за допомогою рекомбінантних методів, як описано вище (наприклад, у клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавців) і, більш того, можна піддавати додатковому дозріванню афінності або за допомогою додаткових раундів скринінгу злиттів mRNA-пептид, в які мутації були введені у початково відібрану послідовність(-ості), або за допомогою інших *in vitro* способів дозрівання афінності рекомбінантних антитіл, як описано вище.

Згідно з іншим підходом, антитіла за даним винаходом також можна одержувати із застосуванням способів дріжджового дисплея, відомих із рівня техніки. У способах дріжджового дисплея генетичні способи застосовують, щоб прив'язати домени антитіла до клітинної стінки дріжджів і представити їх на поверхні дріжджів. Зокрема, такі дріжджі можна використовувати для представлення антиген-зв'язувальних доменів, експресованих на основі репертуарної або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Приклади способів дріжджового дисплея, які можна застосовувати для одержання антитіл за даним винаходом, включають розкриті у Wittrup et al. (патент США № 6699658), включеному у даний документ за допомогою посилання.

5. Одержання рекомбінантних антитіл до CD40

Антитіла за даним винаходом можна одержувати за допомогою будь-якої з ряду методик, відомих із рівня техніки. Наприклад, за допомогою експресії в клітинах-хазяїнах, при цьому вектор(-и) експресії, що кодує(-ють) важкий і легкий ланцюги, трансфікують у клітину-хазяїна за допомогою стандартних методик. Мається на увазі, що різні форми терміну "трансфекція" охоплюють широкий спектр методик, які зазвичай застосовуються для введення екзогенної ДНК у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна, наприклад, електропорація, осадження за допомогою фосфату кальцію, трансфекція, опосередкована DEAE-декстраном, тощо. Хоча експресувати антитіла за даним винаходом можливо як у прокаріотичний, так і в еукаріотичний клітинах-хазяїнах, експресія антитіл в еукаріотичних клітинах є переважною, і найбільш переважною – в клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавця, оскільки такі еукаріотичні клітини (і, зокрема, клітини ссавця) з більшою ймовірністю ніж прокаріотичні клітини можуть збирати і секретувати правильно згорнуте та імунологічно активне антитіло.

Переважні клітини-хазяїни, одержані від ссавця, для експресії рекомбінантних антитіл за даним винаходом передбачають клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) (в тому числі клітини dhfr-CHO, описані в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, застосовувані із селективним маркером DHFR, наприклад як описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), NS0 мієломні клітини, клітини COS і клітини SP2. У разі якщо вектори для рекомбінантної експресії, які кодують гени антитіла, вводять у клітини-хазяїни, одержані від ссавця, антитіла одержують шляхом культивування клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього для забезпечення експресії антитіла в клітинах-хазяїнах, або, більш переважно, – секретії антитіла в середовище для культивування, в якому клітини-хазяїни вирощуються. Антитіла можна вилучати із середовища для культивування із застосуванням стандартних способів очищення білка.

Клітини-хазяїни також можна застосовувати для одержання функціональних фрагментів антитіла, таких як Fab-фрагменти або scFv-молекули. Буде зрозуміло, що варіації вищеописаної процедури знаходяться в межах обсягу даного винаходу. Наприклад, може бути необхідним трансфікувати клітину-хазяїн за допомогою ДНК, що кодує функціональні фрагменти або з легкого ланцюга, та/або важкого ланцюга антитіла за даним винаходом. Технологію рекомбінантної ДНК також можна застосовувати для видалення деяких або всіх ДНК, що кодують якийсь один або обидва з легкого і важкого ланцюгів, які не є необхідними для зв'язування антигенів, що становлять інтерес. Антитіла за даним винаходом також охоплюють молекули, експресовані з цих усічених молекул ДНК. Крім того, можна одержувати біфункціональні антитіла, в яких один важкий і один легкий ланцюги належать антитілу за даним винаходом, а інші важкий і легкий ланцюги є специфічними щодо антигена, відмінного від антигенів, що становлять інтерес, шляхом зшивання антитіла за даним винаходом із другим антитілом за допомогою стандартних способів хімічного зшивання.

У переважній системі для рекомбінантної експресії антитіла або його антиген-зв'язувальної частини за даним винаходом, вектор для рекомбінантної експресії, що кодує як важкий ланцюг антитіла, так і легкий ланцюг антитіла, вводять у клітини dhfr-CHO за допомогою трансфекції, опосередкованої фосфатом кальцію. У межах вектора для рекомбінантної експресії кожний із генів важкого і легкого ланцюгів антитіла функціонально пов'язаний із регуляторними елементами енхансер CMV/промотор AdMLP, які управляють високими рівнями транскрипції генів. Вектор для рекомбінантної експресії також несе ген DHFR, який забезпечує можливість відбору клітин CHO, які були трансфіковані вектором, із застосуванням відбору/збільшення

чисельності за присутності метотрексату. Відібрані трансформовані клітини-хазяїни культивують, щоб забезпечити експресію важкого і легкого ланцюгів антитіла, і ціле антитіло вилучають із середовища для культивування. Застосовують стандартні методики молекулярної біології, щоб одержати вектор для рекомбінантної експресії, трансфікувати клітини-хазяїни, проводити відбір трансформантів, культивувати клітини-хазяїни і вилучати антитіло із середовища для культивування. Крім того у даному винаході передбачений спосіб синтезу рекомбінантного антитіла за даним винаходом шляхом культивування клітини-хазяїна за даним винаходом у середовищі, придатному для культивування, доти, доки не синтезується рекомбінантне антитіло за даним винаходом. Спосіб може додатково передбачати виділення рекомбінантного антитіла із середовища для культивування.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу передбачено глікозильоване антитіло або його антиген-зв'язувальна частина, при цьому антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять один або декілька вуглеводних залишків. Зростаючий при *in vivo* синтезі білковий ланцюг може бути підданий додатковому процесингу, відомому як посттрансляційна модифікація. Зокрема, ферментативним шляхом можуть бути додані залишки цукрів (глікозильні групи), цей процес відомий як глікозилювання. Одержані білки, що несуть ковалентно зв'язані олігосахаридні бічні ланцюги, відомі як глікозильовані білки або глікопротеїни. Антитіла являють собою глікопротеїни з одним або декількома вуглеводними залишками в Fc-домені, а також у варіабельному домені. Вуглеводні залишки в Fc-домені чинять великий вплив на ефекторну функцію Fc-домену, при цьому вплив на зв'язування антигена або час напівжиття антитіла є мінімальним (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11–16). На відміну від цього, глікозилювання варіабельного домену може впливати на активність зв'язування антигена в антитіла. Глікозилювання у варіабельному домені може чинити негативний вплив на афінність зв'язування в антитіла, мабуть внаслідок стеричної перешкоди (Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), або призводити до підвищеної афінності щодо антигена (Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

Один аспект даного винаходу спрямований на одержання мутантів за сайтом глікозилювання, в яких був мутований сайт O- або N-зв'язаного глікозилювання антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. Фахівець у даній галузі може одержувати таких мутантів із застосуванням стандартних, добре відомих методів. Мутанти за сайтом глікозилювання, які зберігають біологічну активність, але характеризуються підвищеною або зниженою активністю зв'язування, являють собою інший предмет даного винаходу.

У ще одному варіанті здійснення глікозилювання антитіла або антиген-зв'язувальної частини за даним винаходом є модифікованим. Наприклад, можна одержувати аглікозильоване антитіло (тобто антитіло, у якого відсутнє глікозилювання). Глікозилювання може бути зміненим, наприклад, для підвищення афінності антитіла щодо антигена. Такі вуглеводні модифікації можна здійснювати, наприклад, шляхом зміни одного або декількох сайтів глікозилювання в межах послідовності антитіла. Наприклад, можна зробити одну або декілька амінокислотних замінів, які призводять до виключення одного або декількох сайтів глікозилювання варіабельної ділянки, щоб тим самим виключити глікозилювання у даному сайті. Таке аглікозилювання може підвищувати афінність антитіла щодо антигена. Такий підхід описаний більш детально в публікації згідно PCT WO 2003/016466 A2 і патентах США №№ 5714350 і 6350861, кожний з яких включений у даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті.

Як доповнення або альтернатива, можна одержувати модифіковане антитіло за даним винаходом, яке характеризується зміненим типом глікозилювання, як наприклад гіпофукозильоване антитіло зі зниженою кількістю фукозильних залишків або антитіло з підвищеним вмістом структур із GlcNAc у точках розгалуження. Було продемонстровано, що ці змінені патерни глікозилювання підвищують здатність антитіл до ADCC. Такі вуглеводні модифікації можна здійснювати, наприклад, шляхом експресії антитіла в клітині-хазяїні зі зміненим механізмом глікозилювання. Клітини зі зміненим механізмом глікозилювання були описані у рівні техніки, і їх можна застосовувати як клітини-хазяїни, в яких експресують рекомбінантні антитіла за даним винаходом з одержанням таким чином антитіла зі зміненим глікозилюванням. Див., наприклад, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, а також європейський патент № EP 1176195; публікації згідно PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80, кожна з яких включена в даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті.

Глікозилювання білка залежить від амінокислотної послідовності білка, що становить інтерес, а також клітини-хазяїна, в якій білок експресується. Різні організми можуть виробляти різні ферменти глікозилювання (наприклад, глікозилтрансферази і глікозидази) і мають різні

доступні субстрати (нуклеотидні цукри). Внаслідок таких факторів, патерн глікозилування білка і склад глікозильних залишків можуть відрізнятися залежно від системи хазяїна, в якій експресується конкретний білок. Глікозильні залишки, придатні в даному винаході, можуть включати без обмеження глюкозу, галактозу, манозу, фукозу, N-ацетилглюкозамін і сіалову кислоту. Переважно глікозильоване антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містять такі глікозильні залишки, що патерн глікозилування характерний для молекул людини.

Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що умови глікозилування білка, яке відрізняється, може призводити до характеристик білка, які відрізняються. Наприклад, ефективність терапевтичного білка, одержаного в мікроорганізмі-хазяїні, такому як дріжджі, і глікозильованого з використанням ендогенного шляху дріжджів, може бути зниженою порівняно з ефективністю такого ж білка, експресованого в клітині ссавця, такий як лінія клітин CHO. Такі глікопротеїни також можуть бути імуногенними для людини і демонструвати зменшений час напівжиття *in vivo* після введення. Специфічні рецептори у людини та інших тварин можуть розпізнавати специфічні глікозильні залишки і сприяти швидкому кліренсу білка з кровотоку. Інші несприятливі ефекти можуть передбачати зміни згортання білка, його розчинності, сприйнятливості до протеаз, направленої переміщення, транспорту, компартменталізації, секреції, розпізнавання іншими білками або факторами, антигенності або алергенності. Відповідно, фахівець-практик може надавати перевагу терапевтичному білку зі специфічним складом і патерном глікозилування, наприклад складом і патерном глікозилування, ідентичним або щонайменше аналогічним тому, який утворюється в клітинах людини або у видоспецифічних клітинах ймовірного суб'єкта-тварини.

Експресія глікозильованих білків, відмінна від тієї, яку може забезпечувати клітина-хазяїн, може бути досягнута шляхом генетичної модифікації клітини-хазяїна з тим, щоб вона експресувала гетерологічні ферменти глікозилування. Із застосуванням методик, відомих із рівня техніки, фахівець-практик може одержувати антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини, що проявляють глікозилування білків людини. Наприклад, штами дріжджів були генетично модифіковані для експресії ферментів глікозилування, що не зустрічаються в природі, внаслідок чого глікозильовані білки (глікопротеїни), що виробляються в цих штаммах дріжджів, проявляють глікозилування білків, ідентичне глікозилуванню, що здійснюється в клітинах тварин, зокрема в клітинах людини (публікації заявок на патент США №№ 2004/0018590 і 2002/0137134 та публікація згідно з РСТ WO 2005/100584 A2).

Крім антитіл або їх антиген-зв'язувальних частин даний винахід також спрямований на антиідіотипове (анти-Id) антитіло, специфічне щодо таких антитіл або їх антиген-зв'язувальних частин за даним винаходом. Анти-Id антитіло являє собою антитіло, яке розпізнає унікальні детермінанти, зазвичай асоційовані з антиген-зв'язувальною ділянкою іншого антитіла. Анти-Id можна одержувати шляхом імунізації тварини за допомогою антитіла або його антиген-зв'язувальної частини, або його ділянки, що містить CDR. Імунізована тварина буде розпізнавати і реагувати на ідіотипові детермінанти імунізуючого антитіла і виробляти анти-Id антитіло. Анти-Id антитіло також можна застосовувати як "імуноген" для індукції імунної відповіді у ще однієї тварини з одержанням так званого анти-анти-Id антитіла.

Крім того, фахівцю у даній галузі буде зрозуміло, що білок, який становить інтерес, можна експресувати із застосуванням бібліотеки клітин-хазяїнів, розроблених методами генної інженерії для експресії різних ферментів глікозилування, так що клітини-хазяїни, елементи бібліотеки, виробляють білок, що становить інтерес, із варіантними патернами глікозилування. Потім фахівець-практик може відібрати і виділити білок, що становить інтерес, з особливими новими патернами глікозилування. Переважно, білок з особливим чином відібраним новим патерном глікозилування проявляє покращені або змінні біологічні властивості.

III. Способи застосування антитіл-антагоністів до CD40

Виходячи з їх здатності зв'язуватися з CD40 людини, антитіла до CD40 людини або їх частини за даним винаходом можна застосовувати для виявлення CD40 людини (наприклад, у біологічному зразку, такому як сироватка крові або плазма) із застосуванням зручного імунологічного аналізу, такого як твердофазні імуоферментні аналізи (ELISA), радіоімунологічний аналіз (RIA) або імуногістохімія тканин. У даному винаході передбачено спосіб виявлення CD40 людини в біологічному зразку, який передбачає приведення біологічного зразка в контакт з антитілом або частиною антитіла за даним винаходом і виявлення або антитіла (або частини антитіла), пов'язаного з CD40 людини, або незв'язаного антитіла (або частини антитіла), з виявленням таким чином CD40 людини в біологічному зразку. Антитіло прямо або опосередковано мітять за допомогою детектованої речовини, щоб спростити виявлення зв'язаного або незв'язаного антитіла. Придатні детектовані речовини включають різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали та

радіоактивні матеріали. Приклади придатних ферментів включають пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, β -галактозидазу або ацетилхолінестеразу; приклади придатних комплексів простетичних груп включають стрептавідин/біотин і авідин/біотин; приклади придатних флуоресцентних матеріалів включають умбіліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін-флуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин; приклад люмінесцентного матеріалу включає люмінол; і приклади придатного радіоактивного матеріалу включають ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho або ^{153}Sm .

Як альтернатива міченню антитіла CD40 людини можна кількісно оцінювати в біологічних рідинах за допомогою конкурентного імунологічного аналізу з використанням стандартів rhCD40, мічених детектованою речовиною, і неміченого антитіла до CD40 людини. У даному аналізі об'єднують біологічний зразок, мічені стандарти rhCD40 і антитіло до CD40 людини, і визначають кількість міченого стандарту rhCD40, що зв'язалася з неміченим антитілом. Кількість CD40 людини в біологічному зразку обернено пропорційна кількості міченого стандарту rhCD40, що зв'язалася з антитілом до CD40. Аналогічно, CD40 людини також можна кількісно оцінювати в біологічних рідинах за допомогою конкурентного імунологічного аналізу з використанням стандартів rhCD40, мічених детектованою речовиною, і неміченого антитіла до CD40 людини.

Антитіла і частини антитіл за даним винаходом переважно здатні нейтралізувати активність CD40 людини як *in vitro*, так і *in vivo*. Відповідно, такі антитіла і частини антитіл за даним винаходом можна застосовувати для пригнічування активності hCD40, наприклад у культурі клітин, що містять hCD40, у суб'єктів-людей або в інших суб'єктів-ссавців, що мають CD40, з яким перехресно реагує антитіло за даним винаходом. В одному варіанті здійснення за даним винаходом передбачений спосіб пригнічування активності hCD40, який передбачає приведення hCD40 в контакт з антитілом або частиною антитіла за даним винаходом, внаслідок чого активність hCD40 пригнічується. Наприклад, у випадку культури клітин, що містять або ймовірно містять hCD40, антитіло або частину антитіла за даним винаходом можна додавати в середовище для культивування, щоб пригнітити активність hCD40 в культурі.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу передбачений спосіб зниження активності hCD40 у суб'єкта, переважно у суб'єкта, що страждає від захворювання або порушення, при яких активність CD40 чинить негативний вплив. У даному винаході передбачено способи зниження активності CD40 у суб'єкта, що страждає від такого захворювання або порушення, при цьому спосіб передбачає введення суб'єкту антитіла або частини антитіла за даним винаходом, внаслідок чого активність CD40 у суб'єкта знижується. Переважно, CD40 являє собою CD40 людини, а суб'єкт являє собою суб'єкта-людину. Як альтернатива, суб'єкт може являти собою ссавця, що експресує CD40, з яким здатне зв'язуватися антитіло за даним винаходом. Більш того, суб'єкт може являти собою ссавця, в якого CD40 було впроваджено (наприклад, шляхом введення CD40 або шляхом експресії трансгена CD40). Антитіло за даним винаходом можна вводити суб'єкту-людині з терапевтичною метою. Крім того, антитіло за даним винаходом можна вводити ссавцю, відмінному від людини, що експресує CD40, з яким дане антитіло здатне зв'язуватися, з ветеринарною метою або як тваринна модель захворювання людини. Що стосується останнього, то такі тваринні моделі можуть бути придатні для оцінки терапевтичної ефективності антитіл за даним винаходом (наприклад, тестування доз і періодів часу введення).

Мається на увазі, що термін "порушення, при якому активність CD40 чинить негативний вплив", використовуваний у даному документі, включає захворювання та інші порушення, при яких присутність CD40 у суб'єкта, що страждає від порушення, як було показано, є або ймовірно є або відповідальним за патофізіологію порушення, або фактором, який вносить вклад у погіршення порушення. Відповідно, порушення, при якому активність CD40 чинить негативний вплив, являє собою порушення, при якому зниження активності CD40, як очікується, ослабить симптоми та/або прогресування порушення. Доказом таких порушень може бути, наприклад, підвищення концентрації CD40 у біологічній рідині суб'єкта, що страждає від порушення (наприклад, підвищення концентрації CD40 у сироватці крові, плазмі, синовіальній рідині тощо суб'єкта), яке можна виявити, наприклад, із застосуванням антитіла до CD40, як описано вище. Необмежувальні приклади порушень, які можна лікувати за допомогою антитіл за даним винаходом, а також їхніх варіантів або їхніх антиген-зв'язувальних фрагментів, включають порушення, обговорювані в розділі нижче, які відносяться до фармацевтичних композицій на основі антитіл за даним винаходом. Наприклад, відповідні порушення включають без обмежень системний червоний вовчак (SLE), дискоїдний вовчак, люпус-нефрит, саркоїдоз, ювенільний артрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, синдром Рейтера, анкілозуювальний спондилоартрит, подагричний артрит, відторгнення трансплантата органа або тканини, реакцію "трансплантат проти хазяїна", розсіяний склероз, гіпер-IgE-синдром, вузликовий поліартеріїт,

первинний біліарний цироз печінки, запальне захворювання кишечника, хвороба Крона, целиацію (глютензалежна ентеропатія), аутоімунний гепатит, перніціозну анемію, аутоімунну гемолітичну анемію, псоріаз, склеродермію, важку міастенію, аутоімунну тромбоцитопенічну пурпуру, аутоімунний тиреоїдит, хворобу Грейвса, тиреоїдит Хашимото, хворобу імунних комплексів, синдром хронічної втоми та імунної дисфункції (CFIDS), поліміозит і дерматоміозит, кріоглобулінемію, тромболізис, кардіоміопатію, звичайну пухирчатку, інтерстиційний фіброз легенів, саркоїдоз, цукровий діабет I типу і II типу, гіперчутливість 1, 2, 3 типу і 4 уповільненого типу, алергію або алергічні порушення, астму, синдром Черджа-Строса (алергічний гранулематоз), атопічний дерматит, алергічний і простий контактний дерматит, кропив'янку, IgE-опосередковану алергію, атеросклероз, васкуліт, ідіопатичні запальні міопатії, гемолітичну хворобу, хворобу Альцгеймера і хронічну запальну демієлінізуючу полінейропатію. У конкретному варіанті здійснення захворювання або порушення являє собою хронічне запальне порушення. У конкретному варіанті здійснення порушення, при якому активність CD40 чинить негативний вплив, являє собою запальне захворювання кишечника (IBD), у тому числі без обмежень хворобу Крона або виразковий коліт.

В інших варіантах здійснення антитіло до CD40 або антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом застосовують для лікування порушення, при якому активність TNF α чинить негативний вплив, у тому числі без обмежень ревматоїдного артриту, виразкового коліту, гнійного гідраденіту, ювенільного ідіопатичного артриту, псоріатичного артриту, псоріазу, анкілозуючого спондилоартриту і хвороби Крона. В одному варіанті здійснення порушення, при якому активність TNF α чинить негативний вплив, являє собою увеїт.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування суб'єкта-людини із запальним захворюванням кишечника (IBD).

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування виразкового коліту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування хвороби Крона.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування системного червоного вовчака (SLE).

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування саркоїдозу.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування суб'єкта-людини з ювенільним артритом.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування ревматоїдного артриту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування псоріатичного артриту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування суб'єкта-людини з анкілозуючим спондилоартритом.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування гнійного гідраденіту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування увеїту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування синдрому Шегрена.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування псоріазу.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування атопічного дерматиту.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують для лікування склеродермії.

mAb до CD40 за даним винаходом будуть мати потенціал для лікування як пацієнтів, що не піддавалися впливу біологічних препаратів, так і групи з недостатньою клінічною відповіддю на антитіло до TNF, внаслідок центральної ролі CD40 як у природженій, так і в адаптивній імунних відповідях. У даному винаході передбачено лікування, здатне пригнічувати передачу сигналу за допомогою CD40, що супресує молекулярні шляхи, такі як вироблення TNF і IL-23, а також

експресію молекул адгезії/костимулюючих молекул, які підтримують хронічне запалення в травному каналі. Виходячи з визначення профілю експресії у пацієнтів із хворобою Крона, які одержували лікування за допомогою антитіл до TNF, лікування за допомогою антитіл до CD40 може мати потенціал виходу за рамки групи пацієнтів із клінічною відповіддю на антитіла до TNF для лікування більш широкої групи пацієнтів із хворобою Крона. У певних варіантах здійснення даного винаходу передбачений спосіб лікування підгрупи пацієнтів з IBD, у яких відсутня клінічна відповідь на терапію антитілами до TNF. Такі пацієнти з IBD можуть мати хворобу Крона або виразковий коліт, і у них або клінічна відповідь була відсутня, або спостерігалася обмежена відповідь на лікування за допомогою інгібітора TNF α , такого як без обмежень інфліксимаб, адаліумаб, цертолізумаб пегол або голіумаб. Антитіла-антагоністи до CD40, описані у даному документі, можна застосовувати для лікування пацієнта з відсутністю клінічної відповіді при терапії, направлений на TNF, у якого є хвороба Крона або виразковий коліт. У певних варіантах здійснення даного винаходу передбачений спосіб лікування пацієнта, що одержував лікування, наприклад дорослого пацієнта з помірним - важким ступенем активної хвороби Крона, який являє собою пацієнта з відсутністю клінічної відповіді при терапії, спрямованій на TNF.

Антитіла за даним винаходом або їх антиген-зв'язувальні частини можуть застосовуватись окремо або в комбінації для лікування таких захворювань. Слід розуміти, що антитіла за даним винаходом або їх антиген-зв'язувальну частину можна застосовувати окремо або в комбінації з додатковим засобом, наприклад терапевтичним засобом, причому вказаний терапевтичний засіб вибирає фахівець у даній галузі, виходячи з його цільового призначення. Наприклад, додатковий засіб може являти собою терапевтичний засіб, який вважається в даній галузі техніки придатним для лікування захворювання або патологічного стану, які лікують за допомогою антитіла за даним винаходом. Додатковий засіб також може являти собою засіб, яке надає корисну властивість терапевтичній композиції, наприклад засіб, який впливає на в'язкість композиції. Також слід розуміти, що комбінації, які повинні бути включені в даний винахід, являють собою комбінації, придатні для їх цільового призначення. Засоби, викладені нижче, наводяться з метою ілюстрації і не мають на увазі як такі, що обмежують. Комбінації, які являють собою частину винаходу, можуть являти собою антитіла за даним винаходом і щонайменше один додатковий засіб, вибраний із переліку нижче. Комбінація також може включати більше одного додаткового засобу, наприклад два або три додаткових засоби, якщо комбінація є такою, що сформована композиція здатна виконувати передбачену для неї функцію.

Комбінована терапія може передбачати один або декілька антагоністів CD40, наприклад антитіла до CD40 або їх фрагменти, які складені та/або вводяться спільно з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, наприклад, одним або декількома інгібіторами цитокінів і факторів росту, імуносупресорами, протизапальними засобами (наприклад, системними протизапальними засобами), протифіброзними засобами, інгібіторами метаболізму, інгібіторами ферментів та/або цитотоксичними або цитостатичними засобами, інгібіторами мітозу, протипухлинними антибіотиками, імуномодуючими засобами, векторами для генної терапії, алкілувальними засобами, антиангіогенними засобами, антиметаболітами, боровмісними засобами, хемопротекторними засобами, гормонами, антигормональними засобами, кортикостероїдами, фотоактивними терапевтичними засобами, олігонуклеотидами, радіонуклідними засобами, інгібіторами топоізомери, інгібіторами тирозинкінази або радіосенсибілізаторами, як описано більш детально у даному документі.

В одному варіанті здійснення антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з другим засобом для лікування запального захворювання кишечника (IBD). У певних випадках здійснення другий засіб являє собою месаламін, балсалазид, азатіоприн, 6-MP, метотрексат, інфліксимаб, цертолізумаб, адаліумаб, голіумаб, наталізумаб, ведолізумаб, устекіумаб або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з другим засобом для лікування SLE, при цьому другий засіб являє собою нітропасту/нітрогліцерин, ніфедипін, силденафіл, тадалафіл або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з другим засобом для лікування SLE, при цьому другий засіб являє собою кортикостероїд, продуцент ендогенних стероїдів, NSAID, протизапальний засіб, хвороба-модифікуючий антиревматичний лікарський засіб (DMARD), імуносупресорний засіб, антикоагулянт або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіла до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за

даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з кортикостероїдом для лікування SLE. Приклади кортикостероїдів, які можна застосовувати, включають преднізолон, метилпреднізолон, преднізон або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації із засобом, який здійснює вироблення ендogenous стероїдів, наприклад кортикотропін (Актар), для лікування SLE.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з місцевим або ін'єкційним терапевтичним засобом для лікування SLE. Приклад такого терапевтичного засобу включає без обмежень кортизон, гідрокортизон, пімекролімус крем, такролімус мазь, іміквімод або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з нестероїдним протизапальним лікарським засобом (NSAID) для лікування SLE. Приклад NSAID, яке можна застосовувати в комбінованій терапії, включає без обмежень індометацин, набуметон, целекоксиб, ібупрофен, напроксен, диклофенак або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з протизапальним лікарським засобом для лікування SLE. У додаткових варіантах здійснення протизапальний лікарський засіб являє собою ацетамінофен та/або саліцилати.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з хвороба-модифікуючими антиревматичними лікарськими засобами (DMARD) для лікування SLE. Приклад DMARD включає без обмежень гідроксихлорохін (Плаквеніл), хлорохін, метотрексат (Ревматрекс), лефлуномід (Арава), сульфасалазин або їхні комбінації.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з белімумабом (Бенліста), ритуксимабом (Ритуксан), Ig, що вводиться внутрішньовенно, або їх комбінаціями.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з імуносупресорним засобом для лікування SLE. Приклади імуносупресорного засобу включають без обмежень азатиоприн (Імуран), циклофосфамід (Цитоксан), циклоспорин, такролімус і мікофенолат.

В одному варіанті здійснення антитіло до CD40 або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом, наприклад Ab102, застосовують у комбінації з протизгортальним засобом для лікування SLE. Приклади протизгортального засобу включають без обмежень аспірин, гепарин, варфарин та еноксапарин (Ловенокс).

Додаткові приклади переважних додаткових терапевтичних засобів, які можна вводити спільно та/або складати з одним або декількома антагоністами CD40, наприклад антитілами до CD40 або їхніми фрагментами. Такі комбінації можна застосовувати для лікування пов'язаних із CD40 порушень, викладених у даному документі. Додаткові приклади терапевтичних засобів, які можна вводити спільно та/або складати з одним або декількома антитілами до CD40 або їхніми фрагментами, включає одне або декілька з: антагоністів TNF (наприклад, розчинний фрагмент TNF-рецептора, наприклад p55- або p75-TNF-рецептор людини або його похідні, наприклад TNFR-IgG розміром 75 кДа (злитий білок TNF-рецептора-IgG розміром 75 кДа, ENBREL)); антагоністів TNF-ферменту, наприклад, інгібіторів TNF-перетворюючого ферменту (TACE); антагоністів мускаринових рецепторів; антагоністів TGF-бета; інтерферону-гамма; перфенідону; хіміотерапевтичних засобів, наприклад, метотрексату, лефлуноміду або сиролімуму (рапаміцину) або їхнього аналога, наприклад CCI-779; інгібіторів COX2 та cPLA2; нестероїдних протизапальних лікарських засобів (NSAID); імуномодуляторів; інгібіторів p38, TPL-2, MK-2 та інгібіторів NFkB, серед інших.

Інші переважні комбінації являють собою цитокін-супресуючий(-і) протизапальний(-і) лікарський(-і) засіб(-оби) (CSAID); антитіла або антагоністи до інших цитокінів або факторів росту людини, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, інтерферонів, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF і ендотеліну-1, а також до рецепторів цих цитокінів і факторів росту. Антитіла за даним винаходом або їх антиген-зв'язувальні частини можна об'єднувати з антитілами до молекул клітинної поверхні, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA або їхні ліганди, у тому числі CD154 (gp39 або CD40L).

Переважні комбінації терапевтичних засобів можуть створювати перешкоди в різних точках запального каскаду; переважні приклади включають антагоністи TNF, подібні химерним,

гуманізованим або людським антитілам до TNF, адалімумаб (HUMIRA; D2E7; публікація згідно PCT № WO 97/29131), CA2 (REMICADE), CDP 571 і розчинні p55- або p75-TNF-рецептори, їхні похідні (p75TNFR1gG (ENBREL) або p55TNFR1gG (LENERCEPT), а також інгібітори TNF-перетворюючого ферменту (TACE); аналогічно інгібітори IL-1 (інгібітори інтерлейкін-1-перетворюючого ферменту, IL-1RA тощо) можуть бути ефективними з тієї ж причини. Інші переважні комбінації включають у себе інтерлейкін 4.

Схеми прийому можна регулювати, щоб забезпечити оптимальну потрібну відповідь (наприклад, терапевтичну або профілактичну відповідь). Наприклад, можна вводити єдину болюсну дозу, декілька розділених доз можна вводити протягом деякого часу або дозу можна пропорційно знижувати або підвищувати відповідно до потреб терапевтичної ситуації. Особливо доцільно складати парентеральні композиції в одиничну лікарську форму для простоти введення і однорідного дозування. Термін одинична лікарська форма, використовуваний у даному документі, означає фізично дискретні одиниці, придатні як одноразові дози для суб'єктів-савців, що підлягають лікуванню; причому кожна одиниця містить заздалегідь встановлену кількість активної сполуки, розрахованої на те, щоб викликати потрібний терапевтичний ефект, у поєднанні з потрібним фармацевтичним носієм. Специфікація для одиничної лікарської форми за даним винаходом обумовлена і безпосередньо залежить від (а) унікальних характеристик активної сполуки і конкретного терапевтичного або профілактичного ефектів, яких потрібно досягти, і (b) обмежень, властивих для галузі техніки складання цієї активної сполуки для лікування чутливості у індивідуумів.

Слід зазначити, що величини дозування можуть варіювати залежно від типу і важкості патологічного стану, який потрібно ослабити. Також буде зрозуміло, що в разі будь-якого конкретного суб'єкта, специфічні схеми прийому згодом слід коригувати згідно з індивідуальними потребами і професійною думкою особи, яка вводить або контролює введення композицій, і що діапазони доз, викладені у даному документі, є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження обсягу або застосування заявленої композиції на практиці.

В іншому аспекті даної заявки представлено спосіб лікування (наприклад, вилікування, супресування, полегшення, відстрочки або запобігання появи або запобігання повторній появі або рецидиву) або запобігання порушенню, при якому активність CD40 чинить негативний вплив, у суб'єкта. Спосіб передбачає введення суб'єкту CD40-зв'язувального засобу (зокрема, антагоніста), наприклад, антитіла до CD40 або його фрагмента, описуваних у даному документі, в кількості, достатній для лікування або запобігання порушенню, асоційованому з CD40. Антагоніст CD40, наприклад антитіло до CD40 або його фрагмент, можна вводити суб'єкту окремо або в комбінації з іншими терапевтичними способами впливу, описаними у даному документі.

В іншому аспекті даної заявки передбачений спосіб виявлення присутності CD40 у зразку *in vitro* (наприклад, біологічному зразку, такому як сироватка крові, плазма, тканина, біоптат). Заявлений спосіб можна застосовувати для діагностики порушення, наприклад запального порушення. Спосіб передбачає: (i) приведення зразка або контрольного зразка в контакт з антитілом до CD40 або його фрагментом, описуваними у даному документі; і (ii) виявлення утворення комплексу між антитілом до CD40 або його фрагментом і зразком або контрольним зразком, де статистично значущу зміну в утворенні комплексу у зразка відносно контрольного зразка вказує на присутність CD40 у зразку.

У ще одному аспекті даної заявки передбачений спосіб виявлення присутності CD40 *in vivo* (наприклад, *in vivo* візуалізація у суб'єкта). Заявлений спосіб можна застосовувати для діагностики порушення, наприклад CD40-асоційованого порушення. Спосіб передбачає: (i) введення антитіла до CD40 або його фрагмента, описуваних у даному документі, суб'єкту або контрольному суб'єкту в умовах, які забезпечують можливість зв'язування антитіла або фрагмента з CD40; і (ii) виявлення утворення комплексу між антитілом або фрагментом і CD40, де статистично значущу зміну в утворенні комплексу у суб'єкта відносно контрольного суб'єкта вказує на присутність CD40.

Заміни амінокислотних залишків у Fc-частині для зміни ефекторної функції антитіла відомі з рівня техніки (Winter et al., патенти США №№ 5648260; 5624821). Fc-частина антитіла опосередковує декілька важливих ефекторних функцій, наприклад, індукцію цитокінів, ADCC, фагоцитоз, комплементзалежну цитотоксичність (CDC) і час півжиття/імунний кліренс антитіла та комплексів антиген-антитіло. У деяких випадках ці ефекторні функції є потрібними для терапевтичного антитіла, але в інших випадках можуть бути непотрібними або навіть шкідливими, залежно від терапевтичної мети. Певні ізотипи IgG людини, зокрема IgG1 і IgG3, опосередковують ADCC і CDC шляхом зв'язування відповідно і Fc μ R, і молекули комплементу C1q. Неонатальні Fc-рецептори (FcRn) являють собою найважливіші компоненти, що

визначають час напівжиття для циркулюючих антитіл. У ще одному варіанті здійснення щонайменше один амінокислотний залишок замінений у константній ділянці антитіла, наприклад Fc-ділянці антитіла, внаслідок чого ефекторні функції антитіла змінюються.

В одному варіанті здійснення передбачено мічене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина, де антитіло або частина антитіла за даним винаходом є дериватизованими або зв'язаними з однією або декількома функціональними молекулами (наприклад, іншим пептидом або білком). Наприклад, мічене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина за даним винаходом можуть бути одержані шляхом функціонального зв'язування антитіла або частини антитіла за даним винаходом (шляхом утворення хімічних зв'язків, генетичного злиття, нековалентної асоціації або іншим способом) з одним або декількома іншими молекулярними об'єктами, такими як інше антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло або діатіло), детектовний засіб, фармацевтичний засіб, білок або пептид, які можуть опосередковувати асоціацію антитіла або частини антитіла з іншою молекулою (такою як центральна ділянка на основі стрептавідину або полігістидинова мітка), та/або цитотоксичний або терапевтичний засіб вибраний із групи, що складається з інгібітора мітозу, протипухлинного антибіотика, імуномодулюючого засобу, вектора для генної терапії, анкілізуючого засобу, антиангіогенного засобу, антиметаболіту, боровмісного засобу, хемопротекторного засобу, гормону, антигормонального засобу, кортикостероїда, фотоактивного терапевтичного засобу, олігонуклеотиду, радіонуклідного засобу, інгібітора топоізомерази, інгібітора тирозинкінази, радіосенсибілізатора та їхні комбінації.

Придатні детектовні засоби, за допомогою яких антитіло або частина антитіла за даним винаходом можуть бути дериватизованими, включають флуоресцентні сполуки. Ілюстративні флуоресцентні детектовні засоби включають флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, 5-диметиламін-1-нафталінсульфонілхлорид, фікоеритрин тощо. Антитіло може також бути дериватизоване за допомогою детектовних ферментів, таких як лужна фосфатаза, пероксидаза хрому, глюкооксидаза тощо. Якщо антитіло дериватизоване за допомогою детективного ферменту, то його виявляють за допомогою додавання додаткових реагентів, які фермент використовує для вироблення детективного продукту реакції. Наприклад, якщо присутній детектовний засіб пероксидаза хрому, то додавання пероксиду водню і діамінобензидину призводить до підфарбованого продукту реакції, який є детектовним. Антитіло також можна дериватизувати за допомогою біотину і виявляти за допомогою непрямого вимірювання зв'язування авідину або стрептавідину.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу передбачено кристалізоване антитіло або його антиген-зв'язувальна частина. Переважно даний винахід стосується кристалів цілого антитіла до CD40 і його фрагментів, розкритих у даному документі, а також складів і композицій, які містять такі кристали. В одному варіанті здійснення кристалізоване антитіло або його антиген-зв'язувальна частина характеризуються більшим значенням часу напівжиття *in vivo*, ніж розчинний аналог антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. В іншому варіанті здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальна частина зберігають біологічну активність після кристалізації.

Кристалізоване антитіло або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом можна одержувати згідно зі способами, відомими з рівня техніки і розкритими в WO 02072636, включеному в даний документ за допомогою посилання.

IV. Фармацевтичні композиції

У даному винаході також передбачені фармацевтичні композиції, що містять антитіло або його антиген-зв'язувальну частину за даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть включати "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" антитіла або частини антитіла за даним винаходом. Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка за необхідних доз і періодів часу є ефективною для досягнення потрібного терапевтичного результату. Терапевтично ефективну кількість антитіла або частини антитіла може визначити фахівець у даній галузі, і вона може варіювати згідно з факторами, такими як стадія захворювання, вік, стать і вага індивідуума і здатність антитіла або частини антитіла викликати потрібну відповідь у індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також є такою, при якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти антитіла або частини антитіла переважаються терапевтично корисними ефектами. "Профілактично ефективна кількість" означає кількість, яка, за необхідних доз і періодів часу, є ефективною для досягнення потрібного профілактичного результату. Як правило, оскільки профілактичну дозу застосовують у суб'єктів до прояву захворювання або на його ранній стадії, то профілактично ефективна кількість буде меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

Фармацевтичні композиції, які містять антитіла за даним винаходом, призначені без обмежень для застосування в діагностиці, виявленні або спостереженні за порушенням, у запобіганні, лікуванні, контролі або полегшенні порушення або одного або декількох його симптомів та/або в дослідженні. У конкретному варіанті здійснення композиція містить одне або декілька антитіл за даним винаходом. В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить одне або декілька антитіл за даним винаходом і один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів, відрізняючись від антитіл за даним винаходом, для лікування порушення, при якому активність CD40 чинить негативний вплив. Переважно, відомо, що профілактичні або терапевтичні засоби є придатними для застосування або вже застосовувалися або в даний час застосовуються в запобіганні, лікуванні, контролі або полегшенні порушення або одного або декількох його симптомів. Згідно з цими варіантами здійснення композиція може додатково містити носій, розріджувач або наповнювач.

Антитіла і частини антитіл за даним винаходом можна включати у фармацевтичні композиції, придатні для введення суб'єкту. Як правило, фармацевтична композиція містить антитіло або частину антитіла за даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Термін "фармацевтично прийнятний носій", використовуваний у даному документі, включає будь-які можливі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні засоби і засоби, що уповільнюють всмоктування, тощо, які є фізіологічно сумісними. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв включають одне або декілька з води, сольового розчину, фосфатно-сольового буфера, глюкози, гліцерину, етанолу тощо, а також їхні комбінації. У багатьох випадках буде переважно включати в композицію ізотонічні засоби, наприклад, цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт, сорбіт або хлорид натрію. Фармацевтично прийнятні носії можуть також містити незначні кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні або емульгуючі засоби, консерванти або буфери, які збільшують термін зберігання або ефективність антитіла або частини антитіла.

Відомі різні системи доставки, й їх можна застосовувати для доставки одного або декількох антитіл за даним винаходом або комбінації з одного або декількох антитіл за даним винаходом і профілактичного засобу або терапевтичного засобу, придатних для запобігання, контролю, лікування або полегшення порушення або одного або декількох його симптомів, наприклад, інкапсуляція в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні до експресії антитіла або фрагмента антитіла, опосередкований рецепторами ендоцитоз (див., наприклад, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), конструювання нуклеїнової кислоти як частини ретровірусного або іншого вектора тощо. Способи введення профілактичного або терапевтичного засобів за даним винаходом включають без обмежень парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення, внутрішньопухлинне введення і введення через слизові оболонки (наприклад, інтраназальний і пероральний шляхи). Крім того, можна використовувати легеневе введення, наприклад за допомогою застосування інгалятора або аерозольного інгалятора і складу із засобом для утворення аерозолу. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078; і публікації згідно РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, кожний з яких включений у даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті. В одному варіанті здійснення антитіло за даним винаходом, комбінований терапевтичний засіб або композицію за даним винаходом вводять із застосуванням технології для легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Кембрідж, Массачусетс). У конкретному варіанті здійснення профілактичні або терапевтичні засоби за даним винаходом вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньопухлинно, перорально, інтраназально, в легені або підшкірно. Профілактичні або терапевтичні засоби можна вводити за допомогою будь-якого традиційного шляху введення, наприклад за допомогою інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом всмоктування через епітеліальні або шкірно-слизові вистилання (наприклад, слизову оболонку рота, слизову оболонку прямої кишки і кишечника тощо) і можна вводити разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим.

У конкретному варіанті здійснення може бути бажаним вводити профілактичні або терапевтичні засоби за даним винаходом місцево в ділянку, яка потребує лікування; цього можна досягти, наприклад і не для обмеження, шляхом місцевої інфузії, шляхом ін'єкції або за допомогою імпланту, причому вказаний імплант являє собою пористий або непористий матеріал, який включає мембрани і матриці, такі як мембрани Sialastic, полімери, волокнисті матриці (наприклад, TISSUEL) або колагенові матриці. В одному варіанті здійснення ефективна кількість одного або декількох антитіл-антагоністів за даним винаходом вводять місцево в уражену ділянку суб'єкта для запобігання, лікування, контролю та/або полегшення порушення

або його симптому. В іншому варіанті здійснення ефективну кількість одного або декількох антитіл за даним винаходом вводять суб'єкту місцево в уражену ділянку в комбінації з ефективною кількістю одного або декількох терапевтичних засобів (наприклад, одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів), відмінних від антитіла за даним винаходом, для запобігання, лікування, контролю та/або полегшення порушення або одного або декількох його симптомів.

В іншому варіанті здійснення профілактичний або терапевтичний засоби за даним винаходом можуть доставлятися в системі з контрольованим вивільненням або пролонгованим вивільненням. В одному варіанті здійснення для досягнення контрольованого або пролонгованого вивільнення можна застосовувати насос (див. Langer, вище; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). В іншому варіанті здійснення для досягнення контрольованого або пролонгованого вивільнення терапевтичних засобів за даним винаходом можна застосовувати полімерні матеріали (див. наприклад, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; див. також Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публікацію згідно PCT № WO 99/15154 і публікацію згідно PCT № WO 99/20253. Приклади полімерів, що застосовуються у складах з пролонгованим вивільненням, включають без обмежень полі(2-гідроксиетилметакрилат), полі(метилметакрилат), полі(акрилова кислота), співполімер(етилену і вінілацетату), полі(метакрилова кислота), полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полі(вініловий спирт), поліакриламід, полі(етиленгліколь), полілактиди (PLA), співполімер(лактиду і гліколіду) (PLGA) і поліортоестери. У переважному варіанті здійснення полімер, який застосовується у складі з пролонгованим вивільненням, є інертним, не містить домішок, що вимиваються, стабільний при зберіганні, стерильний і біорозкладаний. У ще одному варіанті здійснення систему для контрольованого або пролонгованого вивільнення можна помістити поблизу профілактичної або терапевтичної мішені, у зв'язку з цим потрібна лише частина системної дози (див., наприклад, Goodson, в Medical Applications of Controlled Release, вище, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Системи для контрольованого вивільнення обговорюються в огляді Langer (1990, Science 249:1527-1533). Будь-яку методику, відому фахівцю у даній галузі, можна застосовувати для одержання складів з пролонгованим вивільненням, що містять один або декілька терапевтичних засобів за даним винаходом. Див., наприклад, патент США № 4526938, публікацію згідно PCT WO 91/05548, публікацію згідно PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application, " Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 і Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery, " Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання в усій їхній повноті.

У конкретному варіанті здійснення, де композиція за даним винаходом являє собою нуклеїнову кислоту, яка кодує профілактичний або терапевтичний засоби, нуклеїнову кислоту можна вводити in vivo для забезпечення експресії закодованого в ній профілактичного або терапевтичного засобів шляхом конструювання її як частини відповідного вектора для експресії нуклеїнової кислоти і введення її таким чином, що вона потрапляє всередину клітини, наприклад, за допомогою застосування ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або за допомогою прямої ін'єкції, або за допомогою застосування бомбардування мікрочастинками (наприклад, генна гармата; біолістика, Dupont), або покриття ліпідами, або рецепторами клітинної поверхні, або трансфікуючими засобами, або за допомогою введення її в поєднанні з гомеобокс-подібним пептидом, який, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Як альтернатива, нуклеїнова кислота може бути введена всередину клітини і вбудована в ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

Фармацевтичну композицію за даним винаходом складають так, щоб вона була сумісна з її можливим шляхом введення. Приклади шляхів введення включають без обмежень парентеральне, наприклад, внутрішньовенне, інтрадермальне, підшкірне, пероральне,

інтраназальне (наприклад, інгаляційне), трансдермальне (наприклад, місцеве), трансмукозальне і ректальне введення. У конкретному варіанті здійснення композицію складають згідно з традиційними процедурами як фармацевтичну композицію, призначену для внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового, перорального, інтраназального або місцевого введення людям. Як правило, композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини у стерильному фізіологічному водному буфері. У разі необхідності композиція може також включати солюбілізуєчий засіб і місцевий анестетик, такий як лігнокаїн, для полегшення болю в місці ін'єкції.

Якщо композиції за даним винаходом повинні вводитися місцево, то композиції можна складати у формі мазі, крему, трансдермального пластиру, примочки, гелю, шампуню, спрею, аерозолі, розчину, емульсії або іншої форми, добре відомої фахівцям у даній галузі. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). У разі нерозпилюваних місцевих лікарських форм, як правило, використовують в'язкі-напівтверді або тверді форми, що містять носій або один або декілька наповнювачів, сумісних з місцевим нанесенням і таких, що характеризуються динамічною в'язкістю переважно більшою, ніж у води. Відповідні склади включають без обмеження розчини, суспензії, емульсії, креми, мазі, порошки, рідкі мазі, бальзами тощо, які за потреби стерилізують або змішують з допоміжними засобами (наприклад, консервантами, стабілізаторами, змочувальними засобами, буферами або солями) для впливу на різні властивості, наприклад такі як осмотичний тиск. Інші придатні місцеві лікарські форми включають розпилювані аерозольні препарати, де активний інгредієнт, переважно в комбінації з твердим або рідким інертними носіями, упакований в суміші з летким компонентом, що перебуває під тиском (наприклад, газоподібним пропелентом, таким як фреон), або в гнучкому флаконі. За потреби, до фармацевтичних композицій і лікарських форм можна також додавати зволожувачі або вологоутримуючі речовини. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі з рівня техніки.

Якщо спосіб за даним винаходом передбачає інтраназальне введення композиції, то композиція може бути складена в аерозольній формі, спреї, аерозолі або у формі крапель. Зокрема, профілактичні або терапевтичні засоби для застосування згідно з даним винаходом з метою зручності можуть доставлятися у формі випуску аерозольного спрею з упаковок, що знаходяться під тиском, або аерозольного інгалятора із застосуванням придатного пропелента (наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, вуглекислого газу або іншого придатного газу). У разі аерозолі, що перебуває під тиском, одиниця дозування може визначатися шляхом забезпечення клапана для доставки відміряної кількості. Капсули і картриджі (наприклад, складені з желатину) для застосування в інгаляторі або інсуфляторі можуть бути складені так, щоб містити порошкову суміш сполуки і придатної порошкової основи, такої як лактоза або крохмаль.

Якщо спосіб за даним винаходом передбачає пероральне введення, то композиції можна складати для перорального введення у формі таблеток, капсул, саше, желатинових капсул, розчинів, суспензій тощо. Таблетки або капсули можна одержувати за допомогою традиційних способів із фармацевтично прийнятними наповнювачами, такими як зв'язувальні засоби (наприклад, прежелатинізований кукурудзяний крохмаль, полівінілпіролідон або гідроксипропілметилцелюлоза); заповнювачі (наприклад, лактоза, мікрокристалічна целюлоза або гідрофосфат кальцію); зм'якшувальні речовини (наприклад, стеарат магнію, тальк або діоксид кремнію); розпушувачі (наприклад, картопляний крохмаль або натрію крохмальгліколят); або зм'якшувальні засоби (наприклад, лаурилсульфат натрію). Таблетки можуть бути покриті за допомогою способів, добре відомих із рівня техніки. Рідкі препарати для перорального введення без обмежень можуть бути у формі розчинів, сиропів або суспензій, або вони можуть бути представлені як сухий продукт для розбавлення водою або іншим придатним середовищем перед застосуванням. Ці рідкі препарати можуть бути одержані за допомогою традиційних способів із фармацевтично прийнятними добавками, такими як суспендуєчі засоби (наприклад, сорбітовий сироп, похідні целюлози або гідрогенізовані харчові жири); емульгуючі засоби (наприклад, лецитин або аравійська камедь); неводні середовища (наприклад, мигдальне масло, олійні естери, етиловий спирт або фракціоновані рослинні олії) і консерванти (наприклад, метил або пропіл-пара-гідроксибензоати або сорбінова кислота). Препарати можуть також містити буферні солі, смакоароматичні, фарбуючі і підсолоджуючі засоби, залежно від обставин. Препарати для перорального введення можуть бути відповідно складені для повільного вивільнення, контрольованого вивільнення або пролонгованого вивільнення профілактичного або терапевтичного засобів.

Спосіб за даним винаходом може передбачати легеневе введення композиції, складеної із

засобом для утворення аерозолі, наприклад шляхом застосування інгалятора або аерозольного інгалятора. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078 і публікації згідно РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті. У конкретному варіанті здійснення антитіло за даним винаходом, комбінований терапевтичний засіб та/або композицію за даним винаходом вводять із застосуванням технології для легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Кембрідж, Массачусетс).

Спосіб за даним винаходом може передбачати введення композиції, складеної для парентерального введення шляхом ін'єкції (наприклад, у формі болюсної ін'єкції або безперервної інфузії). Склади для ін'єкції можуть бути представлені у вигляді одиначної лікарської форми (наприклад, в ампулах або багатодозових контейнерах) із доданим консервантом. Композиції можуть приймати такі форми, як суспензії, розчини або емульсії в олійстих або водних середовищах, і можуть містити засоби для складання, такі як суспендуючі, стабілізуючі та/або диспергуючі засоби. Як альтернатива, активний інгредієнт може перебувати у формі порошку для розбавлення за допомогою придатного середовища (наприклад, стерильної води, яка не містить пірогени) перед застосуванням.

Способи за даним винаходом можуть додатково передбачати введення композицій, складених як препарати-депо. Такіклади тривалої дії можна вводити шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Таким чином, наприклад, композиції можуть бути складені з придатними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, як емульсія в прийнятній олії) або іонообмінними смолами, або як помірно розчинні похідні (наприклад, як помірно розчинні солі).

Способи за даним винаходом охоплюють введення композицій, складених як нейтральні або сольові форми. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, які утворені з аніонами, такими як ті, що походять від соляної, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот тощо, і солі, які утворені з катіонами, такими як ті, що походять від натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксидів тривалентного заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну тощо.

Загалом інгредієнти композицій поставляються або окремо, або змішаними разом в одиначну лікарську форму, наприклад у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритому контейнері, такому як ампула або саше, які показують кількість активного засобу. Якщо способом введення є інфузія, то композицію можна розподілити в інфузійний флакон, який містить стерильну воду фармацевтичного ступеня чистоти або сольовий розчин. Якщо способом введення є ін'єкція, то може бути забезпечена ампула зі стерильною водою для ін'єкції або сольовим розчином, так що інгредієнти можуть бути змішані перед введенням.

Зокрема, у даному винаході також передбачено, що один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій за даним винаходом упаковані в герметично закритий контейнер, такий як ампула або саше, які показують кількість засобу. В одному варіанті здійснення один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій за даним винаходом поставляються у вигляді сухого стерилізованого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритому контейнері і можуть бути розбавлені (наприклад, за допомогою води або сольового розчину) до концентрації, що є придатною для введення суб'єкту. Переважно, один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій за даним винаходом поставляються у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку в герметично закритому контейнері з розрахунку одиначної дози, що становить щонайменше 5 мг, більш переважно щонайменше 10 мг, щонайменше 15 мг, щонайменше 25 мг, щонайменше 35 мг, щонайменше 45 мг, щонайменше 50 мг, щонайменше 75 мг або щонайменше 100 мг. Ліофілізовані профілактичні або терапевтичні засоби або фармацевтичні композиції за даним винаходом слід зберігати при температурах від 2° С до 8° С в їхньому оригінальному контейнері і профілактичні або терапевтичні засоби або фармацевтичні композиції за даним винаходом слід вводити в межах 1 тижня, переважно у межах 5 днів, у межах 72 годин, у межах 48 годин, у межах 24 годин, у межах 12 годин, у межах 6 годин, у межах 5 годин, у межах 3 годин або у межах 1 години після розбавлення. В альтернативному варіанті здійснення один або декілька із профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій за даним винаходом поставляють у рідкій формі в герметично закритому контейнері, який показує кількість і концентрацію засобу. Переважно, рідка форма композиції, що вводиться, поставляється в герметично закритому контейнері з розрахунку щонайменше 0,25 мг/мл, більш

переважно щонайменше 0,5 мг/мл, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2,5 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 75 мг/мл або щонайменше 100 мг/мл. Рідку форму слід зберігати при температурах від 2 °C до 8 °C в її оригінальному контейнері.

5 Антитіла і частини антитіл за даним винаходом можна включати у фармацевтичну композицію, яка є придатною для парентерального введення. Переважно, антитіло або частини антитіла будуть одержані у вигляді ін'єкційного розчину, який містить 0,1-250 мг/мл антитіла. Ін'єкційний розчин може бути складений у вигляді або рідкої, або ліофілізованої лікарської форми в посудині з флінтового або бурштинового скла, ампулі або заздалегідь заповненого шприца. Буфер може являти собою L-гістидин (1-50 мМ), оптимально 5-10 мМ, при pH 5,0-7,0 (оптимально pH 6,0). Інші придатні буфери включають без обмежень сукцинат натрію, цитрат натрію, фосфат натрію або фосфат калію. Хлорид натрію можна застосовувати для модифікування токсичності розчину при концентрації, що становить 0-300 мМ (оптимально 150 мМ у разі рідкої лікарської форми). У разі ліофілізованої лікарської форми можуть бути включені кріопротектори, в першу чергу 0-10 % сахарози (оптимально 0,5-1,0 %). Інші придатні кріопротектори включають трегалозу і лактозу. У разі ліофілізованої лікарської форми можуть бути включені об'ємоутворюючі засоби, в першу чергу 1-10 % маніт (оптимально 2-4 %). Стабілізатори можна застосовувати як у рідкій, так і в ліофілізованій лікарських формах, у першу чергу 1-50 мМ L-метіоніну (оптимально 5-10 мМ). Інші придатні об'ємоутворюючі засоби включають гліцин, аргінін, при цьому можна включати 0-0,05 % полісорбату-80 (оптимально 0,005-0,01 %). Додаткові поверхнево-активні речовини включають без обмежень полісорбат 20 і поверхнево-активні речовини BRIJ. Фармацевтична композиція, яка містить антитіла і частини антитіл за даним винаходом, приготвлена у вигляді ін'єкційного розчину для парентерального введення, може додатково містити засіб, придатний як ад'ювант, як наприклад застосовувані для підвищення всмоктування або поширення терапевтичного білка (наприклад, антитіла). Особливо придатним ад'ювантом є гіалуронідаза, така як HYLENEX (рекомбінантна гіалуронідаза людини). Додавання гіалуронідази в ін'єкційний розчин покращує біодоступність для людини після парентерального введення, зокрема підшкірного введення. Воно також робить можливим збільшення об'єму в місці ін'єкції (тобто більше 1 мл) зі зменшенням болю і дискомфорту і зведенням до мінімуму випадків реакцій у місці ін'єкції. (Див. WO2004078140, US2006104968, включені в даний документ за допомогою посилання).

В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачена фармацевтична композиція, що містить антитіло за даним винаходом, наприклад, антитіло Ab102, гістидин і полісорбат, наприклад полісорбат 80. В одному варіанті здійснення даного винаходу передбачена фармацевтична композиція, яка містить антитіло, що містить важкий ланцюг, який містить амінокислоти під SEQ ID NO: 41, і легкий ланцюг, який містить амінокислоти під SEQ ID NO: 40, гістидин і полісорбат, наприклад полісорбат 80. У певних варіантах здійснення фармацевтична композиція є ліофілізованою.

Композиції за даним винаходом можуть бути у вигляді багатьох різних форм. Вони включають, наприклад, рідкі, напівтверді і тверді лікарські форми, такі як рідкі розчини (наприклад, ін'єкційні та інфузійні розчини), дисперсії або суспензії, таблетки, пігулки, порошки, ліпосоми і супозиторії. Переважна форма залежить від передбаченого способу введення і терапевтичного застосування. Типові переважні композиції перебувають у формі ін'єкційних або інфузійних розчинів, таких як композиції, аналогічні тим, які застосовуються за пасивної імунізації людей за допомогою інших антитіл. Переважним способом введення є парентеральне (наприклад, внутрішньовенне, підшкірне, внутрішньоочеревинне, внутрішньом'язове). У переважному варіанті здійснення антитіло вводять за допомогою внутрішньовенної інфузії або ін'єкції. В іншому переважному варіанті здійснення антитіло вводять за допомогою внутрішньом'язової або підшкірної ін'єкції.

50 Як правило, терапевтичні композиції повинні бути стерильними і стабільними в умовах виробництва і зберігання. Композиція може бути складена у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Стерильні ін'єкційні розчини можна одержати шляхом включення активної сполуки (тобто антитіла або частини антитіла) у потрібній кількості в потрібний придатний розчинник з одним або комбінацією перелічених вище інгредієнтів, за необхідності після стерилізації фільтруванням. Загалом дисперсії одержують шляхом включення активної сполуки у стерильне середовище, яке містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з вищеперелічених. У разі стерильних, ліофілізованих порошків для одержання стерильних ін'єкційних розчинів переважними способами приготування є вакуумне висушування та висушування розпиленням, які дають порошок активного інгредієнта з будь-яким додатковим

потрібним інгредієнтом з їхнього розчину, попередньо простерилізованого фільтруванням. Належну текучість розчину можна підтримувати, наприклад, за допомогою застосування покриття, такого як лецитин, за допомогою підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсії і за допомогою застосування поверхнево-активних речовин. Пролонгованого всмоктування ін'єкційних композицій можна досягати шляхом включення в композицію засобу, який уповільнює всмоктування, наприклад солей моностеаратів і желатину.

Антитіла і частини антитіл за даним винаходом можна вводити за допомогою різних способів, відомих із рівня техніки, хоча для багатьох терапевтичних застосувань переважним шляхом/способом введення є підшкірна ін'єкція, внутрішньовенна ін'єкція або інфузія. Як буде зрозуміло фахівцю у даній галузі, шлях та/або спосіб введення будуть варіювати, залежно від потрібних результатів. В окремих випадках здійснення активну сполуку можна одержувати з носієм, який буде захищати сполуку від швидкого вивільнення, як наприклад склади з контрольованим вивільненням, у тому числі імпланти, трансдермальні пластирі та мікроінкапсульовані системи доставки. Можна застосовувати біорозкладані, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоестери і полімолочна кислота. Багато способів для одержання таких складів є запатентованими або в цілому відомими фахівцям у даній галузі. Див., наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В окремих варіантах здійснення антитіло або частина антитіла за даним винаходом можна вводити перорально, наприклад з інертним розчинником або засвоюваним харчовим носієм. Сполука (та інші інгредієнти, за потреби) також можуть бути поміщені у тверду або м'яку желатинову капсулу, спресовані у таблетки або введені безпосередньо в харчовий раціон суб'єкта. У разі перорального введення терапевтичного засобу сполуки можуть бути об'єднані з наповнювачами і застосовуватися у формі таблеток, що проковтуються, букальних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток тощо. Щоб ввести сполуку за даним винаходом за допомогою введення, відмінного від парентерального, може бути необхідним покрити сполуку за допомогою матеріалу для запобігання її інактивації або ввести сполуку спільно з ним.

В інших варіантах здійснення антитіло або частину антитіла за даним винаходом можна кон'югувати з молекулою на основі полімеру, так що вказана молекула на основі полімеру може надавати антитілу або частині антитіла за даним винаходом відповідний розмір, так що вказане антитіло або частина антитіла за даним винаходом мають переваги від покращеного ефекту проникності та утримування (EPR-ефект) (див. також публікацію згідно РСТ № WO 2006/042146 A2 і публікації заявок на патент США №№ 2004/0028687 A1, 2009/0285757 A1 і 2011/0217363 A1, а також патент США № 7695719 (кожний з яких включено в даний документ за допомогою посилання в повному обсягу і для всіх цілей).

У композиції також можна включати допоміжні активні сполуки. У певних варіантах здійснення антитіло або частину антитіла за даним винаходом складають та/або вводять спільно з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, які придатні для лікування порушень, за яких активність CD40 чинить негативний вплив. Наприклад, антитіло до hCD40 або частину антитіла за даним винаходом можна складати та/або вводити спільно з одним або кількома додатковими антитілами, які зв'язують інші мішені (наприклад, антитілами, які зв'язують цитокіни або які зв'язують молекули клітинної поверхні). До того ж, одне або декілька антитіл за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з двома або більше з вищеописаних терапевтичних засобів. У таких видах комбінованої терапії можна з успіхом використовувати більш низькі дози терапевтичних засобів, що вводяться, уникаючи таким чином можливих проявів токсичності або ускладнень, асоційованих із різними видами монотерапії.

У певних варіантах здійснення антитіло до CD40 або його фрагмент зв'язані із середовищем, що подовжує час напівжиття, відомого із рівня техніки. Такі середовища включають без обмежень Fc-домен, поліетиленгліколь і декстран. Такі середовища описані, наприклад, у заявці на патент США з порядковим № 09/428082 і опублікованій заявці згідно РСТ № WO 99/25044, які цим включені за допомогою посилання для будь-якої мети.

У конкретному варіанті здійснення послідовності нуклеїнової кислоти, які містять нуклеотидні послідовності, що кодують антитіло за даним винаходом або інший профілактичний або терапевтичний засіб за даним винаходом, вводять для лікування, запобігання, контролю або полегшення порушення або одного або декількох його симптомів за допомогою генної терапії. Генна терапія означає терапію, здійснювану шляхом введення суб'єкту експресованої або такої, що експресується, нуклеїнової кислоти. У цьому варіанті здійснення даного винаходу нуклеїнові кислоти виробляють закодоване в них антитіло або профілактичний або

терапевтичний засоби за даним винаходом, які опосередковують профілактичний або терапевтичний ефекти.

Будь-який із методів генної терапії, доступних із рівня техніки, можна застосовувати згідно з даним винаходом. Загальні огляди методів генної терапії див. у Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993) і Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Способи, загальновідомі в галузі техніки технології рекомбінантної ДНК, які можна застосовувати, описані в Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993) і Krieglner, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Детальний опис різних методів генної терапії представлено в US 2005/0042664 A1, який включено у даний документ за допомогою посилання.

Фахівці в даній галузі легко розуміють, що інші відповідні модифікації та адаптації способів за даним винаходом, описаним у даному документі, є очевидними, та їх можна проводити із застосуванням придатних еквівалентів без відступу від обсягу винаходу або варіантів здійснення, розкритих у даному документі. Після наведеного детального опису даний винахід можна буде краще зрозуміти за допомогою посилання на наступні приклади, які включені тільки з метою ілюстрації і не призначені обмежувати даний винахід.

Приклади

Приклад 1. Моноклональні антитіла-антагоністи до CD40 людини (hCD40)

Щоб ідентифікувати антитіла-антагоністи, специфічні щодо CD40, технологію з використанням гібридом застосовували для виділення мишачих моноклональних антитіл до CD40.

Якщо коротко, мишей імунізували за допомогою антигена CD40 людини і ад'юванта. Після імунізації, яка передбачала декілька введень антигена протягом декількох тижнів, сироватку крові збирали у кожної імунізованої тварини. Потім сироватку крові тестували із застосуванням стандартних аналізів ELISA і проточної цитометрії, щоб ідентифікувати сироватку крові з антитілами, які здатні виявляти CD40. Як тільки наявність CD40-специфічних антитіл було виявлено у сироватці крові миші на основі аналізів зв'язування, селезінку миші збирали та клітини, що утворюють антитіла, виділяли відповідно до стандартних методик. Потім спленоцити зливали за допомогою відомих методик для утворення мієломних клітин, що утворюють антитіла. Після злиття гібридами піддавали скринінгу за допомогою ELISA і проточної цитометрії, щоб визначити різні характеристики блокування і нейтралізації антитіл до CD40.

Після скринінгу, тоді як більшість антитіл було ідентифіковано як такі, що мають агоністичну активність, три мишачих моноклональних антитіла (Ab1, Ab2 і Ab3) були ідентифіковані як такі, що мають антагоністичну активність щодо CD40 без значної агоністичної активності. Амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів цих трьох мишачих антитіл описано нижче у таблицях 7-9. CDR у межах варіабельної ділянки важкого (VH) і варіабельної ділянки легкого (VL) ланцюгів показано жирним шрифтом (відповідно CDR1, CDR2 і CDR3).

ТАБЛИЦЯ 7

Амінокислотні послідовності VH і VL мишачого антитіла 1 (Ab1)

SEQ ID NO:	Назва клону	Ділянка антитіла	Опис залишків	Амінокислотна послідовність
5	Ab1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVS CAASGFTFSDYGMN WVRQAPEKGLEWIA YISSGRSNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMTSLR SEDTAMYYCARSWGYFD VWGTGTTTVTVSS
6	Ab1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO: 5	GFTFSDYGMN
7	Ab1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO: 5	YISSGRSNIYYADTVKG
8	Ab1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO: 5	SWGYFDV
9	Ab1	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEMV TMSCKSSQSLLSNGNQ KNYLTWVWFQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFAG SGSGTDFTLTISVQAEDLAV YYCQNDYTYPLTFGAGT KLEIK
10	Ab1	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO: 99	KSSQSLLSNGNQKNYLT
11	Ab1	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO: 9	WASTRES
12	Ab1	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO: 9	QNDYTYPLT

ТАБЛИЦЯ 8

Амінокислотні послідовності VH і VL мишачого антитіла 3 (Ab3)

SEQ ID NO:	Назва клону	Ділянка антитіла	Опис залишків	Амінокислотна послідовність
4	Ab3	VH		QVQLQQSGAELARPGASV KMSCKAFGYTFTS YTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSSDYPNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYY CARWGYSFDYWGGGT TLTVSS
5	Ab3	VH	Залишки 26-35 із SEQ ID NO: 44	GYTFTSYTMH
6	Ab3	CDR-H1	Залишки 50-66 із SEQ ID NO: 44	YINPSSDYPNYNQKFKD
7	Ab3	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO: 44	WGYSFDY

ТАБЛИЦЯ 8

Амінокислотні послідовності VH і VL мишачого антитіла 3 (Ab3)

SEQ ID NO:	Назва клону	Ділянка антитіла	Опис залишків	Амінокислотна послідовність
8	Ab3	VL		DIVMTQAAPSVSVIPGESVSI SCRSSK SLLHSNGNT YLYWFLQRPQGSPQYLIYRMSTLASGVPDRFSGS GSGTAFTLRISRVEAEDVG VYYCMQHLEYPLTFGA GTKLELK
9	Ab3	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO: 48	RSSK SLLHSNGNTYLY
10	Ab3	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO: 48	RMSTLAS
11	Ab3	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO: 48	MQHLEYPLT

ТАБЛИЦЯ 9

Амінокислотні послідовності VH і VL мишачого антитіла 2 (Ab2)

SEQ ID NO:	Назва клону	Ділянка антитіла	Опис залишків	Амінокислотна послідовність
75	Ab2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVS CAASGFTFSDYGMNWVRQSP EKGLEWIA YISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDN AKNTLFL QMTSLRSED TAMY YCAR SWGYFDVWGTGTTVTVSS
6	Ab2	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO: 75	GFTFSDYGMN
42	Ab2	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO: 75	YISSGRGNIYYADTVKG
8	Ab2	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO: 75	SWGYFDV
76	Ab2	VL V		DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDL AVYYCQNDYTYPLTFGAGTKLELK
10	Ab2	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO: 76	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	Ab2	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO: 75	WASTRES

Амінокислотні послідовності VH і VL мишачого антитіла 2 (Ab2)

SEQ ID NO:	Назва клону	Ділянка антитіла	Опис залишків	Амінокислотна послідовність
12	Ab2	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO: 75	QNDYTYPLT

Консенсусні послідовності CDR-ділянок із трьох мишачих моноклональних антитіл-антагоністів до CD40 (Ab1, Ab2 і Ab3) були ідентифіковані і представлені вище у таблиці 5. Вирівнювання амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок трьох мишачих антитіл також представлені на фігурі 4А (легкий ланцюг) і 4В (важкий ланцюг).

Мишачі варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів (VH і VL) цих трьох антитіл клонували із застосуванням ПЛР зі зворотною транскриптазою (RT-PCR). Ці VH- і VL-ділянки (описані вище у таблицях 7-9) згодом клонували у вектори, що містять константні ділянки імуноглобуліну (Ig) людини, і потім експресували в клітинах-хазяїнах, одержаних від ссавців, як химерні антитіла. У цих химерних антитіл людини (константні ділянки людини та мишачі варіабельні ділянки) потім визначали характеристики із застосуванням *in vitro* аналізів, щоб визначити, чи має кожне з них антагоністичний та/або агоністичний ефекти.

FACS-аналіз застосовували, щоб визначити, чи здатні три химерних антитіла до CD40 зв'язувати або huCD40, або CD40 макаки-крабоїда, експресований на клітинах ембріональної нирки людини (НЕК). Тоді як кожне з трьох химерних антитіл могло зв'язувати CD40 людини, експресований на клітинах НЕК, тільки два з химерних антитіл розпізнавали молекулу макаки-крабоїда – химерне антитіло 3 (chAb3) не зв'язувалося із CD40 макаки-крабоїда. Результати дослідження щодо зв'язування з використанням FACS узагальнено у таблиці 10.

FACS-аналіз також застосовували для визначення того, чи могли три химерних антитіла пригнічувати зв'язування розчинного ліганду CD40 (sCD40L) із CD40. Із застосуванням клітин НЕК, що експресують CD40, вимірювали значення IC₅₀. Як описано у таблиці 10, кожне з химерних антитіл було здатне блокувати зв'язування CD40 з його лігандом.

Додатково до аналізів зв'язування, антагоністичну та агоністичну активності вимірювали із застосуванням CD40-експресувальної лінії клітин із геном-репортером, яка експресує CD40 людини, зв'язаний із NFκB-активованою лужною фосфатазою (AP). В аналізі лінії клітин, що експресує CD40, з геном-репортером, якщо сигнал одержано завдяки CD40, активація NFκB приводить до секреції AP, яку вимірюють за допомогою колориметричного субстрату. Щоб визначити антагоністичну активність, лінію клітин (НЕК) із геном-репортером для виявлення CD40 культивували або з лінією клітин Jurkat, яка експресує CD40L (для забезпечення фізіологічної взаємодії з лігандом), або з розчинним CD40L (наприклад, His-CD40L, згаданим у таблиці 10). Вимірювали здатність антитіл до CD40 блокувати сигнал за участю NFκB. Для вимірювання агоністичної активності лінію клітин із геном-репортером для виявлення CD40 людини безпосередньо обробляли за допомогою антитіл до CD40 і вимірювали сигнал за участю NFκB. Типові дані аналізів на антагоністичну і агоністичну активності щодо CD40 для цих трьох химерних антитіл узагальнено у таблиці 10 та на фігурах 1А і 1В.

ТАБЛИЦЯ 10

Узагальнення функціональних характеристик химерних антитіл до CD40

Химерні антитіла до CD40 (hCg1-LALA)	FACS-зв'язування HEK huCD40	FACS-зв'язування HEK cyCD40	FACS-блокування HEK із CD40 IC50, нМ	Агоніст: аналіз HEK із геном-репортером для виявлення huCD40	Антагоніст: аналіз із геном-репортером для виявлення His-CD40L IC50, нМ	Антагоніст: аналіз із Jurkat/геном-репортером IC50, нМ
Химерне Ab1 (chAb1)	Так	Так	2,3	Hi	0,4	51
Химерне Ab3 (chAb3)	Так	Hi	1,4	Hi	0,2	0,9
Химерне Ab2 (chAb2)	Так	Так	1,4	Hi	0,3	3,4

Як описано у таблиці 10 і на фігурі 1, химерні антитіла до CD40 проявляли антагоністичну активність без детекторної агоністичної активності. З урахуванням результатів вищенаведених експериментів варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів з антитіл-антагоністів до CD40, Ab1 і Ab3, відбирали для гуманізації.

Приклад 2. Гуманізація антитіл-антагоністів до CD40, Ab1 і Ab3

Гуманізація антитіла-антагоніста до CD40 Ab1

Гуманізовані антитіла одержували на основі послідовностей CDR варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) і варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) із Ab1. Зокрема, послідовності зародкового типу людини відбирали для конструювання CDR-прищеплених гуманізованих антитіл на основі Ab1, в яких CDR-домени з VH- і VL-ланцюгів Ab1 прищеплювали на різні акцепторні послідовності важкого та легкого ланцюгів людини. На основі вирівнювань послідовностей VH- і VL-ділянок моноклонального антитіла Ab1, наступні послідовності людини були відібрані як акцептори:

1.IGHV3-21*01 і IGHJ6*01 для конструювання акцепторних послідовностей важкого ланцюга;

2.IGHV3-48*01 і IGHJ6*01 як альтернативний акцептор для конструювання важкого ланцюга;

3.IGKV4-1*01 і IGKJ2*01 для конструювання акцепторних послідовностей легкого ланцюга;

4.IGKV2-40*01 і IGKJ2*01 як альтернативний акцептор для конструювання легкого ланцюга.

Потім одержували CDR-прищеплені антитіла за допомогою прищеплення відповідних CDR із VH- і VL-ділянок Ab1 в акцепторні послідовності, описані в 1-4 вище.

Для одержання гуманізованого антитіла зі зворотною(-ими) мутацією(-ями) каркасної ділянки, мутації каркасної ділянки ідентифікували і вводили в CDR-прищеплені антитіла. Ці мутації вводили із застосуванням стандартних методик, у тому числі de novo синтез варіабельного домену зі зворотною мутацією(-ями) і мутагенними олігонуклеотидними праймерами в полімеразних ланцюгових реакціях. Для кожного із CDR-прищеплених антитіл (що містять CDR з антитіла Ab1) конструювали різні комбінації зворотних мутацій та інших мутацій наступним чином. (Зверніть увагу: номери залишків для нижчезгаданих мутацій основані на системі нумерації Kabat).

У разі важких ланцюгів CDR-прищеплених антитіл піддавали зворотній мутації один або декілька з наступних залишків на стику Vernier і VH/VL: V48I та/або S49A.

У разі легких ланцюгів CDR-прищеплених антитіл піддавали зворотній мутації наступний залишок на стику Vernier і VH/VL: Y36F.

Описи варіабельних ділянок гуманізованих антитіл, що походять від мишачого моноклонального Ab1, наведено нижче:

- гуманізована Ab1 (huAb1VH.1) являє собою CDR-прищеплену VH-ділянку Ab1, яка містить послідовності каркасних ділянок IGHV3-21*01 і IGHJ6*01;

- гуманізована Ab1VH.1a (huAb1VH.1A) являє собою гуманізований важкий ланцюг, який містить амінокислотні послідовності huAb1VH.1 з наступними двома зворотними мутаціями каркасної ділянки: V48I, S49A;

- гуманізована Ab1VL.1 (huAb1VL.1) являє собою CDR-прищеплену VL-ділянку Ab1, яка містить послідовності каркасних ділянок IGKV4-1*01 і IGKJ2*01; і
 - гуманізована Ab1VL.1a (huAb1VL.1A) являє собою гуманізований легкий ланцюг на основі huAb1VL.1 і містить 1 запропоновану зворотну мутацію каркасної ділянки: Y36F.

Зверніть увагу:IGHV3-21_IGHJ6 означає антитіло, яке містить послідовності варіабельної ділянки, що відповідають IGHV3-21*01 і IGHJ6*01.

Потім гуманізовані варіабельні ділянки клонували у вектори експресії IgG для визначення функціональних характеристик чотирьох різних гуманізованих антитіл, основаних на наступних комбінаціях варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів:

- A. huAb1VH.1/VL.1
- B. huAb1VH.1A/VL.1
- C. huAb1VH.1/VL.1A
- D. huAb1VH.1A/VL.1A

Амінокислотні послідовності варіабельної ділянки і CDR вищенаведених гуманізованих антитіл описані у таблиці 11 нижче.

ТАБЛИЦЯ 11

Послідовності VH- і VL-ділянок гуманізованих версій антитіла 1 (huAb1)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
13	huAb1VH.1/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWVSYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:13	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:13	SWGYFDV
14	huAb1VH.1/VL.1 VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:14	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:14	WASTRES
12	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:14	QNDYTYPLT
15	huAb1VH.1A/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWVSYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG

Послідовності VH- і VL-ділянок гуманізованих версій антитіла 1 (huAb1)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
8	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWGYFDV
14	huAb1VH.1A/VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQNDYTYPLTFGQGGTKLEIK
10	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:14	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:14	WASTRES
12	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:14	QNDYTYPLT
13	huAb1VH.1/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFT FSDYGMNWRQAPGKGLEWVSYISSGR SNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTT VTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:13	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:13	SWGYFDV
16	huAb1VH.1/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKL EIK
10	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:16	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:16	WASTRES
12	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:14	QNDYTYPLT
15	huAb1VH.1A/VL.1A	VH		EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTF SDYGMNWRQAPGKGLEWYIYISSGRSNI YYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG

Послідовності VH- і VL-ділянок гуманізованих версій антитіла 1 (huAb1)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
8	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWGYFDV
16	huAb1VH.1A/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NSGNQKNYLTWFQQKPGPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:16	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:16	WASTRES
12	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:16	QNDYTYPLT

Як описано вище, CDR гуманізованих версій VH- і VL- ділянок Ab1 були ідентичні мишачому антитілу Ab1.

Гуманізація антитіла-антагоніста 3 (Ab3) до CD40

- 5 Гуманізовані антитіла також одержували на основі послідовностей CDR варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) і варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) із Ab3. Послідовності зародкового типу людини відбирали для конструювання CDR-прищеплених гуманізованих антитіл на основі Ab3, в яких CDR-домени з VH- і VL-ланцюгів Ab3 прищеплювали на різні акцепторні послідовності важкого та легкого ланцюгів людини. На основі вирівнювань
- 10 послідовностей VH- і VL-ділянок моноклонального антитіла Ab3 наступні послідовності людини були відібрані як акцептори:

- 1.IGHV3-69*06 і IGHJ6*01 для конструювання акцепторних послідовностей важкого ланцюга;
- 2.IGHV1-18*01 і IGHJ6*01 як альтернативний акцептор для конструювання важкого
- 15 ланцюга;
- 3.IGKV2-29*02 і IGKJ2*01 для конструювання акцепторних послідовностей легкого ланцюга;
- 4.IGKV2-28*01 і IGKJ2*01 як альтернативний акцептор для конструювання легкого ланцюга.

Одержували CDR-прищеплені антитіла за допомогою прищеплення відповідних CDR із VH- і VL-ділянок Ab3 в акцепторні послідовності, описані в 1-4 вище.

- 20 Для одержання гуманізованого антитіла зі зворотною(-ими) мутацією(-ями) каркасної ділянки цілий ряд мутацій каркасної ділянки ідентифікували і вводили в CDR-прищеплені антитіла. Ці мутації вводили із застосуванням стандартних методик, у тому числі de novo синтез варіабельного домену зі зворотною(-ими) мутацією(-ями) і мутагенними олігонуклеотидними праймерами в полімеразних ланцюгових реакціях. Для кожного із CDR-прищеплених антитіл (які
- 25 містять CDR з антитіла Ab3) конструювали різні комбінації мутацій, у тому числі зворотні мутації. (Зверніть увагу: номери залишків для нижчезгаданих мутацій ґрунтуються на системі нумерації Kabat).

- У разі важких ланцюгів Ab3 один або декілька з наступних залишків на стику Vernier і VH/VL: M48I, V67A, I69L. Крім того, розглядали можливість зміни Q1E. Мутацію Q1E вводили, щоб
- 30 запобігти утворенню піроглютамату.

У разі легких ланцюгів Ab3 піддавали зворотній мутації один або декілька з наступних залишків на стику Vernier і VH/VL: Y36F, L46Y.

Описи варіабельних ділянок гуманізованих антитіл, що походять від мишачого моноклонального Ab3, розглянуто нижче:

- 35 - huAb3VH.1z являє собою CDR-прищеплену гуманізовану VH Ab3, яка містить послідовності каркасних ділянок IGHV1-69*06 і IGHJ6*01.

- huAb3VH.1 основана на huAb3VH.1z зі зміною Q1E для запобігання утворенню піроглютамату.

- huAb3VH.1A являє собою гуманізований формат, оснований на huAb3VH.1 і такий, що містить 3 додаткових зворотних мутації каркасної ділянки: M48I, V67A, I69L.

5 - huAb3VH.1b являє собою проміжний формат між huAb3VH.1 і huAb3VH.1A та містить 1 запропоновану зворотну мутацію каркасної ділянки: I69L.

- huAb3VL.1 являє собою CDR-прищеплену гуманізовану VL Ab3, яка містить послідовності каркасних ділянок IGKV2-28*01 і IGKJ2*01.

10 - huAb3VL.1A являє собою гуманізований формат, оснований на huAb3VL.1 і такий, що містить 2 зворотних мутації каркасної ділянки: Y36F, L46Y.

- huAb3VL.1B являє собою проміжний формат між huAb3VL.1 і huAb3VL.1A. Він містить 1 запропоновану зворотну мутацію каркасної ділянки: L46Y.

Також зверніть увагу, що *IGHV1-69_IGHJ6 одержаний із послідовностей зародкового типу IGHV1-69*06 і IGHJ6*01.

15 Потім гуманізовані варіабельні ділянки клонували у вектори експресії IgG для визначення функціональних характеристик дев'яти різних гуманізованих антитіл, оснований на наступних комбінаціях варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів:

A. huAb3VH.1/VL.1

B. huAb3VH.1B/VL.1

20 C. huAb3VH.1A/VL.1

D. huAb3VH.1/VL.1A

E. huAb3VH.1B/VL.1A

F. huAb3VH.1A/VL.1A

G. huAb3VH.1/VL.1B

25 H. huAb3VH.1B/VL.1B

I. huAb3VH.1A/VL.1B

Амінокислотні послідовності варіабельної ділянки і CDR вищенаведених гуманізованих антитіл описані у таблиці 12 нижче.

ТАБЛИЦЯ 12

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок гуманізованих антитіл Ab3

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
52	huAb3VH.1/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNYNQKFKDRVIT TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:52	YNPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:52	WGYSFDY
53	huAb3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGNTY LYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLASGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTK LEIK
49	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:53	RSSKSLLSHNGNTYLY

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок гуманізованих антитіл Ab3

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
50	huAb3VH.1/V L.1	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:53	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/V L.1	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:53	MQHLEYPLT
54	huAb3VH.1/V L.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNYNQKFKDRVT LTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/V L.1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:54	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/V L.1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:54	YINPSSDYPNYNQKFKD

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
47	huAb3VH.1/V L.1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:54	WGYSFDY
53	huAb3VH.1/V L.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLH SNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/V L.1	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:53	RSSKSLHSNGNTYLY
50	huAb3VH.1/V L.1	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:53	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/V L.1	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:53	MQHLEYPLT
55	huAb3VH.1/V L.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTS YTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSDYPNYN QKFKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDV VYYCARWGYSFDYWGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/V L.1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:55	GYTFTSYTMH

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
46	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:55	WGYSFDY
53	huAb3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLH SNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
49	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:53	RSSKSLHNSNGNTYLY
50	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:53	RMSTLAS
51	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:53	MQHLEYPLT
52	huAb3VH.1/VL.1A	VL		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGY TFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPS SDYPNYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARWGYSFDYWGGQT TVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:52	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:52	WGYSFDY
56	huAb3VH.1/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLH HSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMSTL ASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:56	RSSKSLHNSNGNTYLY
50	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:56	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:56	MQHLEYPLT
54	huAb3VH.1B/VL.1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTF TSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSDY PNYNQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLR SEDVAVYYCARWGYSFDYWGGGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:54	GYTFTSYTMH

46	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:54	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:54	WGYSFDY

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
56	huAb3VH.1B/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSL LHSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMS TLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:56	RSSKSLLSNGNTYLY
50	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:56	RMSTLAS
51	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:56	MQHLEYPLT
55	huAb3VH.1A/VL.1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGY TFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPS SDYPNYNQKFKDRATLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWGYSFDYWGQG TTVTSS
45	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:55	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:55	WGYSFDY
56	huAb3VH.1A/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSL HSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMS LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE VGVIYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:56	RSSKSLLSNGNTYLY
50	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:56	RMSTLAS
51	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:56	MQHLEYPLT
52	huAb3VH.1/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYT FTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSD YPNYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARWGYSFDYWGQGTTVTSS
45	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:52	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:52	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:52	WGYSFDY

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
57	huAb3VH.1/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL LHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQYLIYRMS TLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVMYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:57	RSSKSLLSNGNTYLY
50	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:57	RMSTLAS
51	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:57	MQHLEYPLT
54	huAb3VH.1B/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYT FTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSD YPNYNQKFKDRVTLTADKSTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARWGYSFDYWGQGTTVTVS S
45	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:54	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:54	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:54	WGYSFDY
57	huAb3VH.1B/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQYLIYR MSTLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKL EIK
49	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:57	RSSKSLLSNGNTYLY
50	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:57	RMSTLAS
50	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:57	MQHLEYPLT
55	huAb3VH.1A/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGY TFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPS SDYPNYNQKFKDRATLTADKSTSTAYME LSSLRSEDVAVYYCARWGYSFDYWGQ GTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:55	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:55	YINPSSDYPNYNQKFKD
47	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:55	WGYSFDY
57	huAb3VH.1A/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQYLIYR MSTLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
49	huAb3VH.1A/V L.1B	CDR-L1	Залишки 24-39 із SEQ ID NO:57	RSSKSLHNSGNTYLY
50	huAb3VH.1A/V L.1B	CDR-L2	Залишки 55-61 із SEQ ID NO:57	RMSTLAS
51	huAb3VH.1A/V L.1B	CDR-L3	Залишки 94-102 із SEQ ID NO:57	MQHLEYPLT

Як описано вище, CDR гуманізованих версій VH- і VL- ділянок Ab3 були ідентичні мишачому антитілу Ab3.

Оскільки Ab3 не зв'язувалося з CD40 макаки-крабїда (див. приклад 1), для подальшого аналізу відбирали гуманізовані версії Ab1.

Приклад 3. Модифікація CDR1 VL-ділянки гуманізованих антитіл Ab1

Дослідження гуманізованих послідовностей VH- і VL- ділянок антитіла Ab1, описаних вище, ідентифікувало послідовність потенційного мотиву дезамідування (мотив "NS"), наявного відкрито в CDR1 легкого ланцюга. Ідентифікували сайт мотиву "NS", який може приводити до дезамідування і гідролізу і приводить до сукцинімідної проміжної сполуки і аспартил-ASP або ізо-ASP. Таким чином, послідовність мотиву виключали із послідовностей CDR1 VL-ділянки гуманізованого Ab1. Видалення мотиву "NS" дасть можливість покращити виробництво антитіла.

Подальша розробка гуманізованого Ab1 привела до шести різних антитіл. Примітно, що чотири зберегли антагоністичну активність, тоді як два стали антитілами-агоністами (huAb1v4 і huAb1v3). Як показано у таблиці 14, huAb1v4 і huAb1v3 проявляли агоністичну активність, як визначено за допомогою аналізу з геном-репортером для виявлення huCD40, водночас не проявляючи антагоністичної активності, як визначено в аналізі з Jurkat/геном-репортером. Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок, а також CDR варіантів гуманізованих антитіл Ab1 (huAb1v1-huAb1v6) описано нижче у таблиці 13.

ТАБЛИЦЯ 13

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок варіанта гуманізованого антитіла Ab1 (huAb1v#)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
13	huAb1v3	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWV RQAPGKGLEWVSYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGT TVTVSS
6	huAb1v3	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:13	GFTFSDYGMN
7	huAb1v3	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:13	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v3	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:13	SWGYFDV
43	huAb1v3	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLGNQKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
17	huAb1v3	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:43	KSSQSLNLGNQKNYLT

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок варіанта гуманізованого антитіла Ab1 (huAb1v#)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
11	huAb1v3	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:43	WASTRES
12	huAb1v3	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:43	QNDYTYPLT
15	huAb1v4	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWV RQAPGKGLEWIAIYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVT VSS
6	huAb1v4	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v4	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v4	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWGYFDV
77	huAb1v4	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNPGNQKNY LTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
74	huAb1v4	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:77	KSSQSLNPGNQKNYLT
11	huAb1v4	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:77	WASTRES
12	huAb1v4	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:77	QNDYTYPLT
15	huAb1v5	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNW VRQAPGKGLEWIAIYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQG TTVTVSS
6	huAb1v5	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v5	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v5	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWGYFDV
18	huAb1v5	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLTGNQKNY LTWFQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
19	huAb1v5	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:18	KSSQSLNLTGNQKNYLT
11	huAb1v5	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:18	WASTRES
12	huAb1v5	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:18	QNDYTYPLT

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок варіанта гуманізованого антитіла Ab1 (huAb1v#)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
15	huAb1v6		VH-ділянка	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIAISSGRSNIYYADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVW GGGTTTVTVSS
6	huAb1v6	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v6	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v6	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWG YFDV
43	huAb1v6	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNLGNQKN YLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTK LEIK
17	huAb1v6	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:43	KSSQSLLNLGNQKNYLT
11	huAb1v6	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:43	WASTRES
12	huAb1v6	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:43	QNDYTYPLT
15	huAb1v1	VH		EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSDYGMNW VRQAPGKGLEWIAISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGGGT TVTVSS
6	huAb1v1	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v1	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v1	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWG YFDV
20	huAb1v1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQKNY LTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKLEIK
21	huAb1v1	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11	huAb1v1	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:20	WASTRES
12	huAb1v1	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:20	QNDYTYPLT
13	huAb1v2	VH		EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWVS YISSGRSNIYYADTVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVW GGGTTTVTVSS

ТАБЛИЦЯ 13

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянок варіанта гуманізованого антитіла Ab1 (huAb1v#)

SEQ ID NO:	Клон	Ділянка антитіла	Залишки	Амінокислотна послідовність
6	huAb1v2	CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO:15	GFTFSDYGMN
7	huAb1v2	CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO:15	YISSGRSNIYYADTVKG
8	huAb1v2	CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO:15	SWG YFDV
18	huAb1v2	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNTGNQK NYLTW FQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQ GTKLEIK
19	huAb1v2	CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO:18	KSSQSLNTGNQKNYLT
11	huAb1v2	CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO:18	WASTRES
12	huAb1v2	CDR-L3	Залишки 95-103 із SEQ ID NO:18	QNDYTYPLT

Додатково до модифікації мотиву "NS" у CDR1 VL-ділянки варіанти huAb1v2 і huAb1v3, описані вище у таблиці 13, мають додаткові мутації каркасної ділянки у своїх VH-доменах.

У таблиці 14 нижче представлено узагальнення активності зв'язування, агоністичної та антагоністичної активностей варіантів. Опис аналізів можна знайти вище у прикладі 2. Мотив "NS", який був підданий мутації в CDR1 VL-ділянки, підкреслено в таблиці 14 нижче. Як описано у таблиці 14, антитіла huAb1v4 (містить мутацію "P" в CDR1-доміні VL-ділянки) і huAb1v3 (містить мутацію "L" в CDR1-доміні VL-ділянки та мутації каркасної ділянки в межах VH-ділянки) проявляли агоністичну активність, незважаючи на те, що вони походять із вихідного антитіла з антагоністичною активністю.

ТАБЛИЦЯ 14

Узагальнення послідовності та функцій варіантів гуманізованих антитіл

Гуманізовані варіанти 163-2.1F2.2B5	LCDR1 VL-ділянки Послідовність (KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10))	Блокування sCD40L	Агоніст: аналіз із геном-репортером для виявлення huCD40, IC50, нМ	Антагоніст: аналіз із Jurkat/геном- репортером, IC50, нМ
huAb1v4	KSSQSLNPGNQKNYLT (SEQ ID NO: 74)	Так	49	Hi
huAb1v6	KSSQSLNLGNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Так	Hi	85,0
huAb1v1	KSSQSLNLRGNQKNYLT (SEQ ID NO: 21)	Так	Hi	55
huAb1v2*	KSSQSLNTGNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Так	Hi	>100
huAb1v5	KSSQSLNTGNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	Так	Hi	>100
huAb1v3*	KSSQSLNLGNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	Так	79	Hi

*Додаткові відмінності каркасних ділянок у VH-ділянці

Для подальшого дослідження і покращення відбирали гуманізоване антитіло до CD40 huAb1v1.

5 Приклад 4. Розробка CDR2 HC антитіла до CD40 huAb1v1

Із варіантів, описаних у прикладі 3, антитіло huAb1v1 було відібрано для подальшого аналізу. Щоб додатково покращити ефективність цього антитіла, одержували варіанти важкого ланцюга (HC) huAb1v1, що містять мутації в межах CDR2-домену HC. Одержували сімнадцять додаткових варіантів (позначених як huAb1v1CDR2v1-v17). Варіантні HC-ділянки об'єднували в пару з LC huAb1v1 (SEQ ID NO: 20) для досліджень активності, щоб визначити агоністичну й антагоністичну активності. Одержували сімнадцять варіантів важких ланцюгів, і дослідження *in vitro* активності показали, що загалом варіанти зберігали свою антагоністичну активність і неоднорідну ефективність порівняно з huAb1v1. У таблиці 15 показано, що хоча варіанти антитіла зберігали антагоністичну активність, ефективність кожного варіанта варіювала.

ТАБЛИЦЯ 15

Узагальнення функціональних властивостей варіантів CDR2 HC huAb1v1

Розроблені варіанти huAb1v1CDR2	Антагоніст: аналіз із Jurkat/геном-репортером (IC50, нМ)
huAb1v1CDR2v17	503,8
huAb1v1CDR2v16	30,15
huAb1v1CDR2v15	339,7
huAb1v1CDR2v14	21,86
huAb1v1CDR2v13	62,44
huAb1v1CDR2v12	236,1
huAb1v1CDR2v11	>1000
huAb1v1CDR2v10	23,04
huAb1v1CDR2v9	7,06
huAb1v1CDR2v8	>1000
huAb1v1CDR2v7	2,69
huAb1v1CDR2v6	>1000
huAb1v1CDR2v5	>1000
huAb1v1CDR2v4	563,4
huAb1v1CDR2v3	218,7
huAb1v1CDR2v2	>1000
huAb1v1CDR2v1	>1000

Усі варіанти HC huAb1v1 піддавали мутації в положенні S55, як описано нижче у таблиці 16 (положення 55 підкреслено).

ТАБЛИЦЯ 16

Амінокислотні послідовності додаткових VH-ділянок (варіанти huAb1v1VH)

SEQ ID NO:	Клон	VH-ділянка
15	huAb1v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAP GKGLEWIAYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGTTTVTVSS
22	huAb1v1CDR2v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKG LEWIAYISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARSWGYFDVWGQGTTTVTVSS

Амінокислотні послідовності додаткових VH-ділянок (варіанти huAb1v1VH)

SEQ ID NO:	Клон	VH-ділянка
23	huAb1v1CDR2v2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
24	huAb1v1CDR2v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRENIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
25	huAb1v1CDR2v4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
26	huAb1v1CDR2v5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRVNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
27	huAb1v1CDR2v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
28	huAb1v1CDR2v7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
29	huAb1v1CDR2v8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK LEWIAIYISSGRINIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
30	huAb1v1CDR2v9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK LEWIAIYISSGRQNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
31	huAb1v1CDR2v10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRWNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
32	huAb1v1CDR2v11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGK GLEWIAIYISSGRMNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
33	huAb1v1CDR2v12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRKNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
34	huAb1v1CDR2v13	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRHNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
35	huAb1v1CDR2v14	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRFNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
36	huAb1v1CDR2v15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
37	huAb1v1CDR2v16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KLEWIAIYISSGRANIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS

Амінокислотні послідовності додаткових VH-ділянок (варіанти huAb1v1VH)

SEQ ID NO:	Клон	VH-ділянка
38	huAb1v1CDR2v17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPG KGLEWIAIYISSGRPNIIYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

У таблиці 17 нижче представлено порівняння CDR2-ділянок HC вищеописаних варіантів huAb1v1 після розробки залишку S55 (виділений жирним/підкреслений). CDR2-ділянка VH huAb1v1 відповідає амінокислотним залишкам 50-66 із SEQ ID NO:15.

5

ТАБЛИЦЯ 17

Вирівнювання варіантів CDR2 HC huAb1v1 у положенні 55

Варіант CDR2 VH-ділянки	CDR2 HC, SEQ ID NO:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
huAb1v1	7	Y	I	S	S	G	R	S	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v1	58	Y	I	S	S	G	R	T	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v2	59	Y	I	S	S	G	R	D	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v3	60	Y	I	S	S	G	R	E	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v4	61	Y	I	S	S	G	R	R	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v5	62	Y	I	S	S	G	R	V	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v6	63	Y	I	S	S	G	R	L	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v7	42	Y	I	S	S	G	R	G	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v8	64	Y	I	S	S	G	R	I	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v9	65	Y	I	S	S	G	R	Q	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v10	66	Y	I	S	S	G	R	W	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v11	67	Y	I	S	S	G	R	M	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v12	68	Y	I	S	S	G	R	K	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v13	69	Y	I	S	S	G	R	H	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v14	70	Y	I	S	S	G	R	F	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v15	71	Y	I	S	S	G	R	Y	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v16	72	Y	I	S	S	G	R	A	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v17	73	Y	I	S	S	G	R	P	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G

Варіабельну ділянку важкого ланцюга huAb1v1CDR2v7 відбирали як таку, що характеризується особливо переважними властивостями порівняно з іншими варіантами, які були одержані й описані вище у таблицях 15-17. Примітно, що huAb1v1CDR2v7 має мутацію у своїй CDR2 HC, ідентифіковану як S55G.

10

Зокрема, визначили, що антитіло, яке містить VL-ділянку антитіла huAb1v1 (SEQ ID NO: 20; див. таблицю 13) і VH huAb1v1CDR2v7, характеризується у 20 разів підвищеною антагоністичною активністю порівняно з антитілом huAb1v1.

VL-ділянку huAbv1 і VH-ділянку huAb1v1CDR2v7 експресували із врахуванням двох різних константних ділянок IgG1 людини. Одну константну ділянку IgG1 вибирали, оскільки її ефекторна функція була ослаблена (hCg1, z, без L234A, L235A або LALA), а іншу константну ділянку IgG1 вибирали, оскільки у неї була ослаблена ефекторна функція, і також вона мала набір мутацій, які посилювали зв'язування FcRn (hCg1, z, без L234A, L235A-T250Q, M428L або LALA-QL). У таблицях 18 і 19 нижче представлена інформація про амінокислотну послідовність важкого і легкого ланцюгів антитіл до CD40 людини Ab101 (VL-ділянка huAbv1/VH-ділянка huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA) і Ab102 (VL-ділянка huAbv1/VH-ділянка huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA-QL). Амінокислотні залишки індивідуальних CDR кожної послідовності VH- або VL-ділянки

15

20

вказано жирним шрифтом. Константні ділянки підкреслено у таблиці 19.

ТАБЛИЦЯ 18

Амінокислотні послідовності VH- і VL-ділянки антитіл до hCD40 Ab101 і Ab102

SEQ ID NO	Ділянка білка		Послідовність	
28	Ab101	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYG MNWVRQAPGKGLEWIAISSGRGNIYYADTVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVWGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO: 28	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO: 28	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO: 28	SWGYFDV
20	Ab101	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGN QKNYL TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
21		CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO: 20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO: 20	WASTRES
12		CDR-L3	Залишки 85-93 із SEQ ID NO: 20	QNDYTYPLT
28	Ab102	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYG MNWVRQAPGKGLEWIAISSGRGNIYYADTVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVWGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	Залишки 26-35 із SEQ ID NO: 28	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	Залишки 50-66 із SEQ ID NO: 28	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	Залишки 99-105 із SEQ ID NO: 28	SWGYFDV
20	Ab102	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGN QKNYLTWVQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGQGTKLEIK
21		CDR-L1	Залишки 24-40 із SEQ ID NO: 20	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	Залишки 56-62 із SEQ ID NO: 20	WASTRES
12		CDR-L3	Залишки 85-93 із SEQ ID NO: 20	QNDYTYPLT

Амінокислотні послідовності важкого ланцюга (HC) і
легкого ланцюга (LC) антитіла Ab101 і Ab102 до hCD40

Клон	SEQ ID NO:	VH-ділянка
Ab101- HC	39	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSQYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYIS SGRGNIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVW GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
Ab101-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
Ab102- HC	41	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSQYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYISS GRGNIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVW GQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVLHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
Ab102-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

Приклад 5. Визначення функціональних характеристик гуманізованих антитіл-антагоністів
Ab101 і Ab102 до hCD40

5 In vitro аналіз

Обидва гуманізовані антитіла до CD40, Ab101 і Ab102, демонстрували антагоністичну активність, аналогічну результатам в аналізі з геном-репортером, описаному в прикладі 1. Оскільки залишкова агоністична активність пов'язана з потенційними ризиками, розробили аналіз на агоністичну активність із застосуванням В-клітин. У даному аналізі антитіла оцінювали щодо пригнічування підвищення рівня CD86 у В-клітинах людини. В-клітини людини конститутивно експресують CD40, і передавання сигналу через CD40 приводить до активації В-клітин, що вимірюють за підвищенням рівня CD86 на поверхні. В-клітини активували за допомогою низької дози антитіла до IgM і IL4 і додавали антитіла-антагоністи до CD40. Посилення активації В-клітин вимірювали як підвищення рівня CD86, що спостерігали за наявності Ab-агоніста CD40, але не Ab-антагоніста CD40, що дає змогу припустити недетектовну агоністичну активність у лідерного кандидата in vitro. Для вимірювання антагоністичної активності первинні В-клітини людини культивували із лінією, яка експресує CD40L, Т-клітин людини, що приводить до активації В-клітин і підвищення рівня експресії CD86 внаслідок взаємодії CD40/CD40L. Вимірювали здатність антагоніста CD40 пригнічувати підвищення рівня CD86 у первинних В-клітинах людини, і для антитіла Ab101 до CD40 показана сильна антагоністична активність, як показано на фігурі 2В. На фігурі 2А показано, що антитіло Ab101 не має агоністичної активності. Примітно, що, як описано на фігурі 2В, антитіло Ab101 характеризується значенням IC₅₀, що становить 1,337, порівняно з антитілом-антагоністом B1b (Boehringer Ingelheim), яке характеризується значенням IC₅₀, що становить 4,213, і антитілом-

агоністом AD11 (Astellas), яке характеризується значенням IC_{50} , що становить 0,1906. Таким чином, антитіло Ab101 (і Ab102 за умови ідентичних варіабельних ділянок) є сильним антагоністом CD40 і не демонструє значної агоністичної активності *in vitro*.

In vivo аналіз

Щоб протестувати *in vivo* активність антитіла Ab101, розробили модель вироблення антитіл людини і виживання В-клітин. Коротко кажучи, коли РВМС людини, виділені від здорових донорів, переносили у scid-мишей з імунodefіцитом, вироблення IgG людини у відповідь на антигени миші стало вимірюваним через 14 днів. Крім того, FACS-аналіз спленоцитів від цих мишей показав приживлення і виживання В-клітин людини. Антиген-специфічну відповідь вимірювали шляхом введення провокаційної проби з вакциною правцевого анатоксину (TetTox) і вимірювання TetTox-специфічних IgG (Naito, 2000; Jeurissen, 2004).

Обробка цих huscid-мишей за допомогою щотижневих доз антитіла до CD40 людини (Ab101, 5 мг/кг, IP) приводила до >85 % пригнічення вироблення IgG людини (фігура 3A) і виживання В-клітин (фігура 3B), що явно демонструє те, що антитіло є активним *in vivo*. Зокрема, на фігурі 3A показано, що антитіло Ab101 було здатне пригнічувати вироблення IgG порівняно із контрольним Ig, а на фігурі 3B узказано, що введення антитіла Ab101 у вищеописану huscid-модель пригнічувало виживання В-клітин.

Приклад 6. Епітопний аналіз Fab Ab102

Кристаліграфічні дослідження здійснювали із застосуванням Fab Ab102, щоб визначити епітоп, з яким зв'язується Fab Ab101. Як описано вище, послідовності VH- і VL-ділянок антитіл Ab101 і Ab102 є однаковими, а отже, застосування Fab Ab102 у наступному дослідженні кристалічної структури створює уявлення про властивості зв'язування обох антитіл Ab101 і Ab102.

Кристалічні структури визначали для Fab Ab102 окремо і для Fab Ab101 у комплексі з антигеном CD40. Одержували кристали і дані збирали за допомогою пучка синхротронного випромінювання IMCA-CAT 17ID. Кристалічну структуру Fab Ab102 визначали до розділення 1,74 Å, а структуру комплексу Fab Ab102/CD40 визначали до розділення 2,84 Å. Кристалічні структури забезпечували ідентифікацію 3D-конформаційного епітопу Fab Ab102.

Ідентифікація 3D-конформаційного епітопу Fab Ab102

У контакти між Fab Ab102 і CD40 залучені як критичні водневі зв'язки, так і гідрофобні взаємодії, які стабілізують поверхню контакту. Перелік молекулярних контактів (виміряних під 4,0 Å) одержували із застосуванням програми NCONT у пакеті програм CCP4. Контакти вимірювали між двома окремими кристаліграфічними мономерами CD40 і відповідним чином зв'язаними легким і важким ланцюгами Fab Ab102. Додаткові контакти спостерігали між Fab Ab102 і кристаліграфічним димером CD40 (димер, утворений за рахунок контактів кристалів). З урахуванням цієї інформації епітоп для зв'язування Fab Ab102 містить топографічну ділянку, яка визначається Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, Thr24-Cys37 із CD40.

Матеріали і способи

Одержання й очищення антигена CD40

Послідовність ДНК, що кодує позаклітинний домен CD40 людини (амінокислоти 1-193), клонували у вектор pHybE, за якою поміщали в рамці зчитування С-кінцевий сайт розщеплення для Тев-протеази і гексагістидинову мітку (SEQ ID NO: 115). Плазмиду трансфікували в клітини HEK293 6е (MRL) із розрахунку 1×10^6 клітин/мл із застосуванням реагенту для трансфекції поліетиленіміну (PEI, Polysciences Inc) із розрахунку співвідношення PEI:ДНК, що становить 4:1. Культуру трансфікованих клітин забезпечували триптоном-N1 (до 0,5 %) через 24 год. після трансфекції. У день 7 після трансфекції культуру трансфікованих клітин очищували за допомогою центрифугування з подальшою фільтрацією через 0,2 мкм фільтр PES (Corning). В очищеному середовищі проводили заміну буфера на PBS, pH 7,4, із застосуванням TFF-системи Kvisk, оснащеної мембранами з порами 10 кДа (GE Healthcare), і завантажували на 5 мл FF-колонку HisTrap (GE Healthcare), врівноважену за допомогою PBS, pH 7,4. Колонку промивали за допомогою 25 мМ імідазолу в PBS, pH 7,4, і зв'язаний білок елюювали за допомогою 250 мМ імідазолу в PBS, pH 7,4. Елюований білок концентрували із застосуванням пристроїв для фільтрування на центрифугі Amicon Ultra-15 (Millipore) із відсіканням за молекулярною вагою 10 кДа і додатково очищували за допомогою SEC на колонці 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare), яку врівноважували і проганяли з PBS, pH 7,4. Фракції, що містять CD40, об'єднували, концентрацію вимірювали за поглинанням за 280 нм і зразки аналізували за допомогою SEC, SDS-PAGE і мас-спектрометрії. [CD40(h)(21-193)]-Tev-His6 ("His6" розкривається в SEQ ID NO: 115) зберігали в аліквотах за -80°C .

Одержання й очищення Fab-фрагмента Ab102 до CD40

Fab-фрагмент Ab102 до CD40 одержували за допомогою розщеплення папаїном вихідного

mAb, як докладно описано нижче. Папаїн активували за допомогою 50 мМ цистеїну в PBS, буфер із pH 7,4. mAb Ab102 до CD40 [hu IgG1/k] LALA QL в PBS, буфер із pH 7,4, змішували з папаїном із розрахунку вагового співвідношення 1:100 папаїну та mAb й інкубували протягом 1 год. за 37 °С. Реакцію зупиняли за допомогою 5мМ йодацетаміду. Суміш очищували на 10 мл смоли Mab SelectSure (GE Healthcare), на якій Fab-фрагмент збирали як проточну фракцію. Проточну фракцію концентрували із застосуванням пристрою для центрифугування Ultrafree-15 Biomax (Millipore) з відсіканням за молекулярною вагою 10 кДа (MWCO). Концентровану суміш очищали на 2,6 см x 60 см колонці Sephacryl 200 HiPrep (GE Healthcare), попередньо врівноваженій за допомогою 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, буфера з pH 7,5. Фракції, що містять Fab-фрагмент (відстежування за допомогою UV-поглинання за 280 нм) об'єднували та заморожували за -80 °С. Чистоту зразка оцінювали за допомогою аналітичної SEC, SDS-PAGE і мас-спектрометрії.

Одержання комплексу CD40/Fab Ab102 до CD40

Рекомбінантний CD40 людини експресували в системі експресії на основі клітин ссавця і потім очищували із застосуванням методик, добре відомих із рівня техніки. Рекомбінантний CD40 людини та білок Fab Ab102 до CD40 змішували із розрахунку молярного співвідношення 1,1:1 та інкубували протягом 4 год. за 4 °С. Зразок із комплексом завантажували на 2,6 см x 60 см колонку Sephacryl 200 HiPrep (GE Healthcare), попередньо врівноважену за допомогою 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, буфера із pH 7,5, за швидкості 1 мл/хв. Фракції, що містять комплекс (відстежування за допомогою UV-поглинання за 280 нм), об'єднували і концентрували до 18 мг/мл із застосуванням пристрою для центрифугування Ultrafree-15 Biomax (Millipore) з відсіканням за молекулярною вагою 10 кДа (MWCO). Чистоту зразка оцінювали за допомогою аналітичної SEC і SDS-PAGE.

Кристалізація Fab Ab102

Fab окремо забезпечували із розрахунку 22,5 мг/мл у 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, pH 7,5. Кристали росли за рахунок дифузії пари за 23 °С. Резервуар містив 25 % (вага/об.) PMME 550, 0,1 М MES pH 6,5, 0,01 М сульфату цинку. Краплю одержували шляхом додавання рівних об'ємів білка та розчину з резервуара. Кристали росли у вигляді товстих призм, і їх піддавали кріопротекції із застосуванням розчину із резервуару з додаванням 10 % (об./об.) пропіленгліколю. Кристали збирали, проводили через кріорозчин і піддавали кріозаморожуванню безпосередньо в рідкому азоті. Дані щодо дифракції до 1,74 Å збирали в газоподібному азоті за 100 К у пучку синхротронного випромінювання 17ID у комплексі Advanced Photon Source, розташованому в Argonne National Laboratories (Аргон, Іллінойс).

Кристалізація Fab Ab102 у комплексі з антигеном CD40

Комплекс Fab забезпечували із розрахунку 18 мг/мл в 50 мМ HEPES, 50 мМ NaCl, pH 7,5. Застосовувана конструкція антигена являла собою [CD40 (h) (21-193)]-TEV-6His ("His6" розкритий у SEQ ID NO: 115). Кристали росли за рахунок дифузії парів за 23 °С. Резервуар містив 2 М сульфату амонію, 0,1 М фосфату-цитрату, pH 4,2. Краплю одержували шляхом додавання рівних об'ємів білка та розчину з резервуара. Кристали росли у вигляді тонких паличок, і їх піддавали кріопротекції із застосуванням 2,5 М сульфату літію. Кристали збирали, проводили через кріорозчин і піддавали кріозаморожуванню безпосередньо в рідкому азоті. Дані щодо дифракції до 2,84 Å збирали в газоподібному азоті за 100 К у пучку синхротронного випромінювання 17ID у комплексі Advanced Photon Source, розташованому в Argonne National Laboratories (Аргон, Іллінойс).

Визначення структури Fab Ab102 і комплексу Fab Ab102 і CD40

Дані щодо дифракції для обох кристалічних структур обробляли із застосуванням програми autoPROC від Global Phasing Ltd.

Набір даних для Fab Ab102 обробляли в групі симетрії C222₁ із наступними розмірами елементарної комірки: a=64,65 b=130,4 c=132,6. Рішення молекулярного заміщення, одержане методом максимальної правдоподібності, визначали із використанням програми PHASER із застосуванням моделі пошуку Fab, про яку повідомлялося раніше (номер доступу в Protein Data Bank 3Q0S). Координати для 1 молекули Fab одержували з урахуванням рішення молекулярного заміщення. Попередню деталізацію одержаного рішення проводили із застосуванням REFMAC і програми BUSTER. Ітеративну побудову моделі білка здійснювали із застосуванням програми COOT і дослідження карт електронної густини 2Fo-Fc і Fo-Fc. Деталізацію закінчували додаванням молекул води із застосуванням BUSTER. Статистичні дослідження кінцевої деталізації вказали на значення R_{free}/R_{work}, які становили 0,23/0,19.

Набір даних для комплексу Fab Ab102 і CD40 обробляли в групі симетрії P2₁2₁2 із наступними розмірами елементарної комірки: a=173,3 b=76,0 c=126,1. Рішення молекулярного заміщення, одержане методом максимальної правдоподібності, визначали із використанням

програми PHASER із застосуванням раніше вирішеного Fab Ab102, про яке повідомлялося вище. Координати для 2 молекул Fab відшукували з урахуванням рішення молекулярного заміщення. Попередню деталізацію одержаного рішення проводили із застосуванням REFMAC і програми BUSTER. Модель для CD40 будували вручну із застосуванням програми COOT і дослідження карт електронної густини 2Fo-Fc і Fo-Fc. Деталізацію закінчували додаванням молекул води із застосуванням BUSTER. Статистичні дослідження кінцевої деталізації вказали на значення $R_{\text{free}}/R_{\text{work}}$, які становили 0,25/0,20.

Приклад 7. Ефективність нейтралізації й агоністична активність Ab102 в аналізі активації моноцитів

Наступні способи застосовували в даному прикладі, в якому досліджували антагоністичну та агоністичну активності Ab102 *in vitro*.

Аналіз на антагоністичну активність. Здатність Ab102 блокувати CD40-опосередковану активацію моноцитів оцінювали в аналізі на антагоністичну активність. Очищені моноцити змішували з 1 мкг/мл MEGACD40L (Enzo) у присутності 80 нг/мл GM-CSF і 80 нг/мл IFN γ за концентрації 2×10^6 /мл. По 50 мкл на лунку вносили в 96-лунковий планшет для культур тканин (TC) з U-подібним дном. Розведення тестованих матеріалів готували в середовищі для культивування і по 50 мкл розведень додавали до моноцитів людини, одержаних від донора. Клітини культивували за 37 °C, 5 % CO $_2$ протягом двох днів перед тим, як збирали супернатанти для аналізу щодо цитокінів (TNF) із застосуванням платформи для імунологічного аналізу Meso Scale Discovery (MSD).

Аналіз на агоністичну активність. Оцінювали здатність Ab102 індукувати активацію моноцитів через CD40. MEGACD40L (Enzo) застосовували як позитивний контроль для активації моноцитів. Очищені моноцити людини розводили до 2×10^6 /мл у середовищі для культивування в присутності 80 нг/мл GM-CSF і 80 нг/мл IFN γ і по 50 мкл/лунка вносили в 96-лунковий TC-планшет із U-подібним дном. Розведення тестованих матеріалів готували в середовищі для культивування і по 50 мкл розведень додавали до моноцитів. Клітини культивували за 37 °C, 5 % CO $_2$ протягом двох днів перед тим, як збирали супернатанти для аналізу щодо цитокінів (TNF) із застосуванням платформи для імунологічного аналізу Meso Scale Discovery (MSD).

Оскільки мієлоїдні клітини відіграють важливу роль у патогенезі хвороби Крона, щоб оцінити функціональну активність Ab102 були розроблені вищезгадані аналізи на основі моноцитів. Передавання сигналу за допомогою CD40 індукує активацію моноцитів і тим самим вироблення запальних цитокінів, таких як TNF. Типові аналізи на антагоністичну та агоністичну активності із застосуванням моноцитів для Ab102 показані відповідно на фігурах 5A і 5B. Як показано на фігурі 5A, Ab102 блокувало експресію TNF-залежним від концентрації чином. У форматі аналізу на агоністичну активність розчинний CD40L індукував вироблення TNF моноцитами з EC $_{50}$, що становить 1,9 нМ, тоді як Ab102 не індукувало вироблення TNF за концентрацій аж до 200 нМ. Як описано на фігурі 5B, рівні TNF під час застосування Ab102 були аналогічні рівням під час застосування негативного контролю (нерелевантного IgG), що вказує на рівень вироблення TNF від невеликого до недетектовного вироблення. Постійні результати одержували для трьох різних донорів, при цьому значення IC $_{50}$ показані у таблиці 20 нижче.

Таблиця 20

Узагальнення оцінки функціональних характеристик Ab102 в аналізі активації моноцитів

Реагент	Експеримент	IC $_{50}$ антагоніста (нМ)
Ab102	1	0,06
	2	0,23
	3	0,11
	Середнє значення $\pm$ SD	0,13 $\pm$ 0,08

Отже, результати тестування Ab102 в обох вищеописаних аналізах на антагоністичну та агоністичну активності показали, що Ab102 являє собою антитіло-антагоніст до CD40, яке практично не проявляє агоністичної активності з відсутністю вимірюваної агоністичної активності.

Приклад 8. Перехресна реактивність Ab102

Тестували перехресну реактивність Ab102 щодо CD40 від різних видів. Під час застосування стандартних методик мічене Alexa 647 Ab102 демонструвало аналогічну кінетику зв'язування з CD40 як людини, так і макаки-крабїда на поверхні В-клітин зі значенням EC $_{50}$, що становить

0,89±0,17 нМ для клітин людини і 1,4±0,15 нМ для клітин макаки-крабоїда, як показано у таблиці 21 нижче. Зв'язування Ab102 з CD40 миші, щура і кролика не можна було виявити за концентрацій аж до 30 мкг/мл (200 нМ).

Таблиця 21

Узагальнення зв'язування Ab102 з різними CD40 на поверхні В-клітин

Реагент	Вид	EC ₅₀ (нМ)
Ab102	Людина	0,89±0,17
	Мавпа	1,4±0,15
	Миша	Не визначено
	Щур	Не визначено
	Кролик	Не визначено

5

Отже, Ab102 зв'язувалося із CD40 людини і макаки-крабоїда, але не демонструвало детективного зв'язування із CD40 миші, щура або кролика із застосуванням стандартних аналізів зв'язування.

10 Приклад 9. Застосування антитіла 138 миші до CD40 для лікування коліту, що розвинувся в результаті перенесення Т-клітин

Наступні способи застосовували в *in vivo* дослідженні для визначення здатності антитіла миші до CD40 (антитіло 138) лікувати коліт. Антитіло 138 до CD40 миші мало характеристики, аналогічні Ab102, наприклад, антитіло 138 являє собою антитіло-антагоніст без значної агоністичної активності, як і Ab102. Таким чином, антитіло 138 є репрезентативним щодо активності Ab102 на мишачій моделі із прикладу 9. Далі описана *in vivo* модель коліту, одержана шляхом перенесення Т-клітин

15

Виділення та ін'єкція інтактних Т-клітин

У день 0 селезінки збирали у мишей balb/c і поміщали в середовище RPMI, доповнене 4 % фетальною бичачою сироваткою (повне середовище), на льоду. Суспензію з окремих клітин одержували за допомогою механічного руйнування і пропускання через 100 мкм сито для клітин в середовище RPMI, доповнене 4 % фетальною бичачою сироваткою (повне середовище). Клітини збирали за допомогою центрифугування (1250 об./хв. протягом 10 хвилин за 4°C) і ресуспендували в буфері Robosep (Stem Cell Technologies). Концентрацію клітин вимірювали із застосуванням лічильника Moxi Mini Cell Counter (Orflo) і доводили до 1×10⁸ клітин/мл у буфері Robosep. CD4+Т-клітини виділяли із застосуванням набору магнітних гранул для негативного відбору (Stem Cell Technologies) згідно зі вказівками виробника. Клітини додатково очищували за допомогою FACS з одержанням популяцій CD4+CD45RB^{high} і CD4+CD45RB^{low}, які збирали відповідно як 42 % найсвітліших і 12 % найтемніших клітин. Клітини підраховували і доводили до 1 × 10⁶ клітин/мл і 0,5 мл (1 × 10⁵ клітин) ін'єктували внутрішньоочеревинно (IP) у SCID-мишей.

20

Лікування

Потім антитіло 138 миші до CD40 вводили IP у різних дозах у PBS два рази/тиждень SCID-мишам (описані вище), починаючи або в момент ін'єкції клітин (профілактичне лікування), або після того, як захворювання було підтверджено за допомогою ендоскопії (терапевтичне лікування). Крім того, було включено ряд контрольних груп. Групи одержували або 1) IP 15 мг/кг антитіла 951 (нерелевантний IgG) у PBS два рази/тиждень, або 2) IP антитіло 138 (антитіло, яке блокує CD40L) у PBS два рази/тиждень. Крім того, в дослідженнях щодо перенесення Т-клітин (ТСТ) або антитіло до р40(IL-12/23), або моноклональне антитіло до TNF вводили як клінічні релевантні контрольні препарати для порівняння.

25

Ендоскопія

У різні моменти часу після ін'єкції клітин у мишей розвиток захворювання оцінювали за допомогою колоноскопії. Після проведення анестезії за допомогою ізофлурану гнучку голку шлункового зонда повільно вводили в анальний отвір і повільно ін'єктували 300 мкл PBS, щоб видалити фекальні гранули. Тваринам давали можливість відійти від анестезії і пересуватися, щоб полегшити проходження будь-яких гранул, що залишилися (приблизно п'ять хвилин). Мишам знову проводили анестезію з ізофлураном і ендоскопічний зонд (Karl Storz) вводили в анальний отвір на глибину 3 см. Фотографічні зображення одержували на відстані 3, 2 і 1 см від краю анального отвору. Пізніше на підставі зображень визначали бали із застосуванням шкали, докладно описаної у таблиці 22 нижче. Бали кожного параметра для кожної із трьох глибин об'єднували з одержанням сумарного бала індексу активності захворювання миші на основі

30

ендоскопії (MEDAI), показаного у таблиці 22. Максимальний бал, який можна було одержати із застосуванням сумарного бала MEDAI, становив 24.

У разі терапевтичного введення доз визначення бала на основі ендоскопії через три тижні після ін'єкції клітин застосовували для підтвердження розвитку захворювання і розподілу тварин у групи для лікування.

Таблиця 22

Визначення бала MEDAI на основі ендоскопії

Параметр	Бал	Опис
Ексудат	0	Норма
	1	покриває <50 % окружності товстої кишки
	2	покриває >50 % окружності товстої кишки
Васкуляризація	0	Норма
	1	Судини роз'єднані, малі судини не розрізняються
	2	Великі судини не розрізняються, мають форму зірочок
	3	Розрізняється поверхнева кровотеча, судини виглядають проникними
Зернистість слизової оболонки	0	Норма
	1	Слабко виражений симптом "бруківки"
	2	Явно виражений і широкий симптом "бруківки"
	3	Випинання слизової оболонки, зменшений просвіт

Гістологія

GI-зразки надавали в касетах, орієнтованих як витягнуті сегменти товстої кишки цілком, що забезпечувало можливість аналізу товстої кишки по всій довжині, та їх обробляли як тканини, що фіксуються у формаліні і заливаються у парафін (FFPE). Блоки нарізали товщиною 5 мікрон і поміщали на скляні предметні скельця перед тим, як проводити імуногістохімічне дослідження для виявлення молекули 1 адаптера, що зв'язує іонізований кальцій (IBA1), із застосуванням антитіла до IBA1 (кат. № 019-19741; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Маркер IBA1 застосовували для ідентифікації макрофагів у зрізах тканини. Предметні скельця дофарбовували метиловим зеленим, зневоднювали і накривали покривним склом.

Потім предметні скельця сканували при збільшенні 4x за допомогою системи візуалізації Vectra і мозаїчні 4x зображення малого збільшення перевіряли перед вибором ділянок для одержання зображень при збільшенні 20x.

За допомогою системи візуалізації Vectra повторно сканували предметні скельця і отримували вибрані 20x зображення великого збільшення при великому розділенні, які потім піддавали алгоритмам аналізу зображень у програмному забезпеченні inForm (Perkin Elmer). Застосовуваний набір алгоритмів inForm має три алгоритми: перший алгоритм задає поріг забарвлювання IBA1 і CD3 у спектрально відображуваних файлах, щоб виключити фонове/стороннє забарвлення. Наступні алгоритми ділять тканину на тканини, що становлять інтерес (власна пластинка, епітелій, м'язовий шар, підслизовий шар і фон), і кількісно оцінюють або CD3, або IBA1 у RGB-зображеннях, одержаних у результаті застосування першого алгоритму.

Дані InForm експортували у текстові файли, які зливали в єдині файли даних для даних або від кожного сегмента тканин, або від сегмента клітин.

На підставі валідації антагоністичної активності в гострих моделях модель хронічного коліту застосовували, щоб провести дослідження для підтвердження механізму дії. Три дослідження проводили для тестування ефекту блокування коліту після перенесення інтактних Т-клітин у хазяїна з імунодефіцитом (SCID-миші). Один рівень дози досліджували в режимах як профілактичного, так і терапевтичного лікування, при цьому в режимі профілактичного лікування перевіряли ефект повної дози.

Ефект дози антитіла 138 миші до CD40, що вводиться в момент перенесення клітин

Ефект дози профілактично введеного антитіла 138 миші до CD40 визначали із застосуванням моделі коліту, одержаної шляхом перенесення Т-клітин. Лікування, яке охоплювало діапазон доз (0,5, 1,5, 5 і 15 мг/кг) починали в момент перенесення клітин. Дози, що зменшуються аж до 1,5 мг/кг, приводили до максимального зниження сумарного бала MEDAI, тоді як 0,5 мг/кг не чинила значного ефекту. Активність антитіла 138 миші до CD40 була еквівалентна стандартній дозі лікарського препарату проти p40IL-12/23, що застосовується як

позитивний контроль. Гістологічний аналіз зрізів товстої кишки показав зменшення числа макрофагів (загальної міри запалення), що добре корелювало з ендоскопічною оцінкою захворювання, як описано на фігурі 6 і фігурі 7. Зокрема, на фігурі 6 описано дозозалежне зниження бала на основі ендоскопії за допомогою профілактичного введення антитіла 138 миші до CD40 у день 39 (кінцевий показник). На фігурі 6 RBlow означає групу негативного контролю. Клітини CD45RBlow не опосередковують захворювання. У даній моделі коліту захворювання опосередковують клітини CD45RBhi, які переносили у тварин. На фігурі 7 показане число IBA1+ макрофагів у товстій кишці мишей (визначено гістологічними методами) й описані нижчі рівні макрофагів за доз, що перевищують 0,5 мг/кг, і нижчі, ніж у p40 позитивного контролю.

Рівні антитіла 138 миші, яке циркулює, до CD40 вимірювали через 96 годин після введення кінцевої дози (еквівалентні C_{trough}), і при цьому було показано, що вони є дозозалежними, як описано на фігурі 8. Найнижчий рівень дози (0,5 мг/кг) приводив до концентрації < нижньої межі кількісного визначення (LLOQ) у всіх, крім однієї тварини в даній групі.

Ефект дози антитіла 138 миші до CD40, що вводиться через 3 тижні після перенесення клітин

Якщо лікування за допомогою антитіла 138 миші до CD40 починали через три тижні після ін'єкції клітин, після ендоскопічного підтвердження захворювання, то дозозалежне зниження сумарного бала MEDAI спостерігали в разі найвищої дози (15 мг/кг), при цьому воно досягало статистичної значущості (фігура 9A). Гістологічний аналіз IBA1+ макрофагів у товстій кишці як міра мієлоїдного запалення давав аналогічні результати, як описано на фігурі 9B. Середнє значення концентрації антитіла 138 у сироватці крові, виміряне через 72 години після введення кінцевої дози, становило 191,9 мкг/мл у тварин, які одержували дозу 15 мг/кг.

Приклад 10. Т-клітиннозалежні гуморальні імунні відповіді у макак-крабоїдів

Аналіз Т-клітиннозалежної гуморальної імунної відповіді (TDAR) проводили у макак-крабоїдів. Макакам із розрахунку дві тварини/стать/група вводили Ab102 за доз, що становлять 0 (тільки середовище) або

10 мг/кг, підшкірно (SC) протягом 5 тижнів. Гемоціанін фісурели (KLH) вводили всім тваринам у день 8. Зразки сироватки крові збирали від кожної тварини в дні -11, -7, 0, 4, 7, 10, 14 і 21 відносно введення KLH. Усіх тварин повертали в

колонію тварин випробувальної лабораторії після завершення останнього запланованого взяття крові (фігура 10).

Було виявлено, що Ab102 супресувало обидві Т-клітиннозалежні гуморальні імунні відповіді з IgM- і IgG-антитілами до KLH порівняно з тваринами, які одержували лікування тільки за допомогою середовища, як показано на фігурі 10.

Результати даного дослідження узгоджувалися з фармакологічним супресуванням

CD40-залежного вироблення IgM- і IgG-антитіл після парентерального введення

прототипного чужорідного білка. Результати дали змогу припустити, що застосування Ab102 може мати значення для лікування вовчака, під час перебігу якого вироблення аутоантитіл є частиною захворювання. Ці результати також підтвердили біологічне значення макак-крабоїдів як придатного виду для доклінічних токсикологічних досліджень. Крім того, дослідження продемонструвало перехресну реактивність щодо CD40 макака-крабоїди і показало *in vivo* активність Ab102 у механізмі (Т-клітинно-залежній гуморальній імунній відповіді), для якого, як відомо, потребується CD40.

Приклад 11. Застосування антитіла 138 миші до CD40 для лікування системного червоного вовчака (SLE)

Унаслідок антагоністичної активності антитіла 138 миші до CD40, яка була показана у вищенаведених гострих моделях і в моделі коліту (див. приклад 9), ефективність цього антитіла миші до CD40 перевіряли на мишачих моделях системного червоного вовчака (SLE). Застосовували дві SLE-моделі: MRL/lpr і NZB/W-F1 (описані в Theofilopoulos and Kono. 1999. Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies. в Lahita R. G., ed., Systemic Lupus Erythematosus, 3rd edn, p. 145). Раціональне обґрунтування для оцінки ефективності лікарського препарату проти CD40 на мишах MRL/lpr і NZB/W-F1 є двояким. По-перше, моделі відрізняються за своїми проявами SLE. У мишей NZB/W-F1 мимовільно розвиваються люпус-нефрит та сіаладеніт, тоді як у мишей MRL/lpr розвиваються прояви в суглобах і шкірі, додатково до нефриту та сіаладеніту (Andrews et al. J. Exp. Med. 148: 1198-1215. 1978). Оскільки пацієнти розрізняються за своїми проявами SLE, то застосування обох моделей дає можливість здійснити оцінку потенційної ефективності у більшості пацієнтів із SLE. По-друге, миші MRL/lpr і NZB/W-F1 відрізняються за генетичною основою їхніх захворювань (Perry et al. J. Biomed. Biotech. 2011, Article ID 271694), а отже, ефективність у різних моделей підвищує впевненість під час перенесення на генетично гетерогенних людей.

11.1. MRL/lpr-модель SLE

Для визначення ефективності мишам вводили антитіло 138 миші до CD40 138 за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції (i.p.), починаючи з віку 10 тижнів із розрахунку доз, вказаних у таблиці 23 нижче. У дослідженні ін'єкції PBS застосовували як негативний контроль, а преднізолон застосовували як позитивний контроль.

Таблиця 23

Група	n	Лікування	Доза
1	18	PBS	2 рази на тиждень, i. p.
2	18	Антитіло 138	15 мг/кг, 2 рази на тиждень, i. p.
3	18	Антитіло 138	5 мг/кг, 2 рази на тиждень, i. p.
4	18	Антитіло 138	1,5 мг/кг, 2 рази на тиждень, i. p.
5	18	Антитіло 138	15 мг/кг, 1 раз на тиждень, i. p.
6	18	Преднізолон	10 мг/кг, PO, sid

Протеїнурію відстежували щотижня за допомогою Albustix (товарний знак тест-смужок для сечі, що застосовуються для тестування на білок у сечі). Сильна протеїнурія, що визначається як ≥ 300 мг/дл, починала розвиватися невдовзі після початку обробки, як показано на фігурі 11A. Як описано на фігурі 11A, до завершення дослідження в день 63, у 50-60 % PBS-контрольних мишей, які не одержували лікування, і мишей, які одержували лікування за допомогою 1,5 мг/кг антитіла до CD40, розвивалася сильна протеїнурія. На відміну від цього, майже в усіх мишей в інших групах лікування зберігалася невисока протеїнурія протягом дослідження. Група лікування з дозою 15 мг/кг 1 раз на тиждень значно відрізнялася від PBS-контролю. Виживання також відстежували, і при цьому було виявлено, що в разі введення доз із розрахунку 15 мг/кг 1 раз на тиждень і 5 мг/кг 2 рази на тиждень виживання значно перевищувало виживання PBS-контрольних тварин, які не одержували лікування, як показано на фігурі 11B. Слід зазначити, що багатьох мишей умертвляли через дистрес, спричинений лімфаденопатією, спричиною мутацією Fas^{lpr}, до того як у них розвинувся нефрит. Таким чином, спостережуване зниження показника виживання не можна приписувати лише нефриту. Незважаючи на це, ці дані вказують на те, що антитіло до CD40 дозозалежним чином запобігало протеїнурії і подовжувало виживання мишей MRL/lpr, схильних до розвитку вовчака.

Ефективність антитіла до CD40 у лікуванні SLE також оцінювали на забарвлених гематоксиліном і еозином (H&E) зрізах тканин, фіксованих у формаліні і залитих у парафін (FFPE), одержаних із нирки, слинної залози та гомілковостопного суглоба мишей із різних груп обробки. Важкість захворювання в усіх тестованих органах у PBS-контрольних мишей, які не одержували лікування, зростала протягом 9 тижнів дослідження, у міру того як миші MRL ставали старшими від 10 тижнів на початку до 19 тижнів у кінці.

У разі нирки лікування за допомогою антитіла до CD40 було ефективним в разі введення з розрахунку 15 мг/кг у зниженні гломерулонефриту як у дні лікування 29, так і 63, як показано на фігурі 12A. Оскільки важкість гломерулонефриту посилювалася у мишей MRL з віком, то лікування за допомогою антитіла до CD40 зберігало ефективність у мінімізації ступеня прояву гломерулонефриту за доз 5 і 15 мг/кг. Антитіло до CD40, яке вводиться в дозі, що становить 15 мг/кг один раз на тиждень, було настільки ж ефективним, як і під час введення дози двічі на тиждень. Антитіло до CD40, яке вводиться в дозі, що становить 5 мг/кг двічі на тиждень, характеризувалося практично такою ж ефективністю. Антитіло до CD40, яке вводиться в дозі, що становить 5 і 15 мг/кг, було ефективним у зниженні периваскулярних (PV) інфільтратів у нирці в дні 29 і 63, як показано на фігурі 12B, при цьому спостерігалася тенденція до зменшення тубулоінтерстиційних (TI) на ранніх етапах захворювання, як показано на фігурі 12C.

У разі слинної залози антитіло до CD40, яке вводиться в дозі, що становить 1,5, 5 і 15 мг/кг, було ефективним у зниженні запалення слинної залози в день 29, водночас доза 15 мг/кг зберігала ефективність у день 63 терапії (фігура 13A). Інфільтрація в слинних залозах змінювалася значним чином у мишей, які не одержували лікування, після дня 29.

У разі тканини суглобів передплесна дози антитіла до CD40, що вводяться, які становлять 1,5, 5 і 15 мг/кг, були ефективними у зниженні запалення навколо суглоба в день 29, водночас доза 15 мг/кг зберігала ефективність у день 63 терапії (фігура 13B). У разі суглобів запалення мало тенденцію до зменшення у мишей віком 19 тижнів порівняно з мишами віком 10 тижнів. Незважаючи на це, лікування за допомогою антитіла до CD40 значно знижувало запалення до практично нульового за дози 15 мг/кг у день 63 терапії.

Утворення гермінативних центрів (GC) потребує взаємодії В- і Т-клітин за рахунок залучення

CD40 на В-клітинах GC за допомогою CD40L на фолікулярних Т-хелперних клітинах (Tfh). GC являють собою анатомічні структури, в яких утворюються плазмоцити і В-клітини пам'яті та в яких відбувається дозрівання афінності і перемикання класу Ig. Вони є критично важливими для розвитку високої афінності та патогенних аутоантитіл в разі SLE.

Антитіло 138 миші до CD40 порушує взаємодію В- і Т-клітин і запобігає утворенню GC. Щоб оцінити ступінь, до якого запобігається утворення GC, кількість В-клітин GC і Tfh-клітин у селезінці визначали за допомогою проточної цитометрії (фігура 14). Кількість Tfh-клітин було значно нижчою, ніж у контролів у день 29 у всіх мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, незалежно від дози. Серед протестованих доз кількість у групі дози 5 мг/кг залишалася значно нижчою, ніж у контролю, в день 63 (фігура 14, див. панелі (i) і (ii)). Число В-клітин GC також було нижче, ніж у контролю, в день 29 за всіх доз антитіла до CD40, і їхнє число залишалося нижчим у день 63 у мишей, які одержували антитіло до CD40 у дозах, що становили 5 і 15 мг/кг. Однак ці відмінності від контролів, які не одержували лікування, не були статистично значущими. Незалежно від цих результатів у даних спостерігалася загальна тенденція у напрямку терапевтичного ефекту для всіх груп доз. До того ж у цих експериментах мишає антитіло до CD40 продемонструвало ступінь агоністичної активності від невеликого до нульового.

Рівні загального IgG, що циркулює, додатково до рівнів аутореактивних антитіл підвищуються з плином часу в разі SLE у мишей і людей. Отже, для оцінки ефекту антитіла до CD40 138 щодо вироблення антитіл досліджували рівні загальних IgM і IgG, що циркулюють. Крім того, також досліджували антитіла до dsDNA, поширене аутоантитіло, асоційоване з вовчаком. Було виявлено, що рівні загального IgG у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла до CD40 у дозах, що становили 15 і 1,5 мг/кг, були значно нижчі від рівнів у контролів, які не одержували лікування в день 29, як описано на фігурі 15A. Значно нижчі рівні загального IgG зберігалися аж до дня 63 у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 із розрахунку 15 мг/кг, як описано на фігурі 15B. Крім того, значно нижчі рівні спостерігали у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 із розрахунку 5 мг/кг, у даний момент часу. Жодних відмінностей не виявили для рівнів IgM, що циркулює.

Титри антитіла до dsDNA не відрізнялися значно у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, і у контрольних мишей, які не одержували лікування, у день 29, як описано на фігурі 16A. Однак у день 63 титри антитіла до dsDNA значно зросли у контрольних мишей, які не одержували лікування, але знизилися у мишей, які одержували лікування за допомогою 15 і 5 мг/кг антитіла 138 до CD40, хоча різниця не була значною, як описано на фігурі 16B.

Результати, одержані у вищеописаному дослідженні (приклад 11.1), показують, що антитіло 138 до CD40 є ефективним у запобіганні розвитку нефриту у мишей MRL/lpr, схильних до розвитку вовчака. Крім того, антитіло 138 до CD40 запобігало розвитку запалення слинних залоз і суглобів. Дане дослідження дає змогу припустити, що антитіло-антагоніст 138 миші до CD40, яке характеризується аналогічними з Ab102 властивостями, є ефективним у лікуванні SLE людини.

11.2. Модель SLE на мишах NZB/W-F₁

Другу мишачу модель SLE також тестували, щоб визначити, чи є антитіло-антагоніст 138 миші до CD40 ефективним для лікування захворювання. Зокрема, для визначення ефективності антитіла 138 до CD40 антитіло тестували на мишах NZB/W-F₁, при цьому застосовували як профілактичну, так і терапевтичну схеми лікування згідно з графіком введення доз, описаним у таблиці 24 нижче. Як і в дослідженні 11.1, PBS слугував як негативний контроль, а преднізолон виступав як позитивний контроль.

Таблиця 24

Профілактичне лікування			
Група	n	Лікування	Доза
1	20	PBS	i. p, 2 рази на тиждень
2	20	Антитіло 138	15 мг/кг, i.p. 2 рази на тиждень
3	20	Антитіло 138	1,5 мг/кг, i.p. 2 рази на тиждень
4	20	Антитіло 138	15 мг/кг, i.p. 1 раз на тиждень
5	20	Преднізолон	10 мг/кг, PO, sid
Терапевтичне лікування			
6	13	PBS	i. p. 2 рази на тиждень

Група	n	Лікування	Доза
7	12	Антитіло 138	15 мг/кг, і.п. 2 рази на тиждень
8	12	Преднізолон	10 мг/кг, РО, sid

У разі профілактичної схеми мишей починали лікувати у віці 26 тижнів. Перевіряли, щоб усі миші мали рівень білка, що становив <300 мг/дл. Для схеми терапевтичного лікування застосовували розподіл в групи, що чергується; мишей, які не одержували лікування, відстежували щотижня щодо протеїнурії і розподіляли в одну з 3 груп схеми терапевтичного лікування, коли у них розвивалася протеїнурія з ≥ 300 мг/дл.

Профілактичне лікування

Протеїнурію відстежували щотижня, і, як показано на фігурі 17A, у приблизно 50 % контрольних мишей, які не одержували лікування, протеїнурія спостерігалася у віці 32 тижні. На відміну від цього, тільки в 1 з мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, і в жодної з мишей, які одержували лікування за допомогою преднізолону, сильна протеїнурія не розвивалася. Ці результати були значущими порівняно з контролем, які не одержували лікування. Виживання, як показано на фігурі 17B, відображало результати щодо протеїнурії, при цьому всі групи лікування значно відрізнялися від PBS-контролів. Таким чином, лікування за обох доз 15 і 1,5 мг/кг запобігало протеїнурії та продовжувало виживання.

Терапевтичне лікування

Терапевтичне лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 було також ефективним на цій другій мишачій моделі SLE. Як показано на фігурі 18A і фігурі 18B, у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, згодом розвивалася слабка протеїнурія, водночас ні у контрольних мишей, які не одержували лікування, ні у мишей, які одержували лікування за допомогою преднізолону, слабка протеїнурія не розвивалася. З урахуванням швидкості нормалізації протеїнурії, як показано на фігурі 18B, було оцінено, що середній час нормалізації протеїнурії становив 23 ± 7 днів. Лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 також значно продовжувало виживання, як описано на фігурі 18C.

Продуктування слини

Вироблення слини вимірювали в обох груп мишей, які одержували профілактичне і терапевтичне лікування, щоб оцінити функцію слинних залоз. Підданим анестезії мишам вводили пілокарпіну нітрат і за період часу, що становив 8 хвилин, слину збирали на ватну паличку. Продуктування слини вимірювали як збільшення чистої ваги ватної палички. У разі дослідження профілактичного лікування було виявлено, що вироблення слини у контрольних мишей, які не одержували лікування, було дуже мінливим, але значно відрізнялося від вироблення NZBWF-1 у молодших мишей, які не захворіли, як описано на фігурах 19A і 19B. Мінливість, очевидно, була зумовлена рівнем розвитку захворювання, оскільки більшість мишей із групи контролю середовищем із найнижчими значеннями вироблення слини мали протеїнурію (фігура 19A і 19B, пурпурний колір порівняно із чорним кольором у групі, що одержувала середовище). Однак важливо, що вироблення слини у мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, було порівняно постійним (фігура 19A) і значимо перевищувало вироблення у контрольних мишей, які не одержували лікування. Хоча всі когорти мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, характеризувалися більш високим рівнем вироблення слини, тільки у когорті, яка одержувала лікування за допомогою дози 1,5 мг/кг, зберігалася значущість під час вимірювання залежно від маси тіла (фігура 19B). Незважаючи на це, ці дані показують, що профілактичне лікування за допомогою антитіла 138 до CD40 може запобігти втраті функції слинних залоз.

У разі мишей, які одержували терапевтичне лікування, було виявлено, що миші, які одержували лікування за допомогою антитіла 138 до CD40, мали значно вищий рівень вироблення слини, ніж контролі, які не одержували лікування (фігура 20 A і 20B). На фігурі 20 A і 20B показано, що вироблення слини зберігалася в разі терапевтичного введення дози антитіла до CD40. Це було очевидно незалежно від того, чи розглядали загальну кількість слини, чи кількість слини у перерахунку на вагу тіла. Примітно, що у мишей, які не одержували лікування, була протеїнурія, тоді як у жодної з мишей, які одержували лікування за допомогою антитіла до CD40, протеїнурії не було. Отже, можна зробити висновок, що терапевтичне введення доз антитіла-антагоніста до CD40, яке практично не проявляє агоністичної активності, запобігає зниженню функції слинних залоз або нормалізує його.

Дане дослідження показує, що антитіло-антагоніст 138 до CD40 було ефективним у запобіганні розвитку нефриту у мишей NZB/W-F1, схильних до розвитку вовчака, і в порятунку цих мишей від нефриту. Крім того, антитіло до CD40 запобігало розвитку запалення слинних залоз і суглобів. Дане дослідження підтверджує гіпотезу про те, що антитіло-антагоніст до

CD40, яке практично не проявляє агоністичної активності, буде ефективним у разі SLE людини. Способи, що застосовуються у прикладах 11.1 і 11.2, передбачали наступне.

Миші MRL/lpr

MRL/lpr: антитіло до CD40 (антитіло 138) вводили і.р. мишам MRL/lpr віком 10 тижнів в одній із 4 доз; 15 мг/кг, 5 мг/кг або 1,5 мг/кг двічі на тиждень або 15 мг/кг один раз на тиждень. Мишей, які одержували лікування за допомогою PBS (середовище) і.р. двічі на тиждень, включали як негативний контроль, а мишей, які одержували лікування за допомогою 10 мг/кг преднізолону PO sid, включали як позитивний контроль.

NZB/W-F₁: антитіло до CD40 138 вводили мишам NZB/W-F₁ в обох схемах профілактичного і терапевтичного лікування. У разі схеми профілактичного лікування мишам вводили антитіло до CD40 і.р., починаючи з віку 26 тижнів в одній із двох доз, двічі на тиждень із розрахунку 15 мг/кг або 1,5 мг/кг. Миші, яким вводили преднізолон із розрахунку 10 мг/кг PO sid або вводили PBS, слугували відповідно як позитивний і негативний контролю. Мишей тестували щодо протеїнурії на початку і всіх мишей із рівнем білка ≥ 300 мг/дл виключали з дослідження профілактичного лікування. У разі схеми терапевтичного лікування мишей починали лікувати, коли у них розвивалася протеїнурія, що становила ≥ 300 мг/дл. Миші одержували антитіло до CD40 і.р. із розрахунку 15 мг/кг двічі на тиждень. Миші, яким вводили преднізолон із розрахунку 10 мг/кг PO sid або PBS, слугували відповідно як позитивний і негативний контролю.

Протеїнурія

Сечу щотижня досліджували на рівень білка із застосуванням індикаторних смужок Albustix (Siemens 2191, Пітсбург, Пенсильванія). Мишей вважали такими, що мають протеїнурію, якщо рівні білка в сечі були підвищені до ≥ 300 мг/дл протягом щонайменше 2 послідовних тестів або перед смертю або умертвінням.

Проточна цитометрія

Суспензії з поодиноких клітин селезінки одержували в забуференому сольовому розчині Хенкса (Invitrogen) з 1 % термоінактивованою фетальною бичачою сироваткою (Invitrogen) і 1х пеніциліном/стрептоміцином (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі). Еритроцити видаляли за допомогою центрифугування і клітини ресуспендували в буфері для забарвлювання (PBS (Invitrogen) із 1,5 % термоінактивованою фетальною бичачою сироваткою і 0,02 % азиду натрію (Sigma)). Клітини забарвлювали за допомогою антитіл проти CD3 (145-2011, BD), CD4 (GK1.5 eBioSciences), ICOS (C398.4A, Biolegend), CXCR5 (L138D7, Biolegend), PD-1 (29F.1A12, Biolegend), GL7 (A488, Biolegend), CD19 (BUV395, BD), CD95 (Jo2, Biolegend). Антитіла безпосередньо зв'язували з флуоресцеїну ізотіоціанатом, фікоеритрином, фікоеритрином і ціаніном 5, алофікоціаніном, перидиніном-хлорофілом і ціаніном 5.5 або біотином. Усі В-клітини ідентифікували як CD19⁺; В-клітини GC як CD19⁺, CD95⁺ і GL7⁺; Tfh-клітини як CD3⁺, CD4⁺, ICOS⁺, CXCR5⁺ і PD-1⁺. Клітини аналізували за допомогою проточного цитометра FACSCalibur (BD Biosciences) і аналізували за допомогою програмного забезпечення FlowJo (версія 8.5, Treestar Inc.).

Гістологія

Коли миші з групи контролю середовищем починали агонізувати, у них збирали тканини нирки, гомілковостопного суглоба та слинних залоз і фіксували в 10 % нейтральному забуференому формаліні. Крім того, у певні проміжні моменти часу ці ж тканини і кров збирали у типових мишей із кожної групи. Тканини фіксували в 10 % нейтральному забуференому формаліні протягом 8 годин, обробляли та заливали у парафін для забарвлювання Н&Е. Запальні інфільтрати оцінювали в нирці, слинних залозах і гомілковостопному суглобі на основі оцінки звичайно забарвлених Н&Е зрізів тканин, фіксованих формаліном і залитих у парафін (FFPE). Для нирки патоморфолог визначав бали по 3 мкм забарвлених Н&Е зрізах за шкалою від 0 до 4 щодо гломерулонефриту, периваскулярної інфільтрації і тубулоінтерстиційної інфільтрації, на основі наступних критеріїв визначення балів. Гломерулонефрит: 0 = відсутність захворювання; 1 = сегментарне потовщення мезангію в рідкісних клубочках; 2 = сегментарне - дифузне потовщення мезангію у більшості клубочків; 3 = дифузне потовщення мезангію, підвищений вміст клітин, збільшені подоцити, відсутність спайок; 4 = дифузне потовщення мезангію з ділянками, сильніше ураженими, ніж інші, з одним або кількома із наступного: коагульовані білки, фіброз, знижений вміст клітин, збільшені подоцити, спайки і серпоподібні утворення боуменової капсули. Периваскулярне запалення нирки: 0 = аж до невеликого числа рідкісних лімфоцитів; 1 = невелике число лімфоцитів, що утворюють пухкі агрегати; 2 = лімфоцити, що утворюють дискретні невеликі агрегати; 3 = поляризовані агрегати з лімфоцитів, які випинаються у просвіт прилеглої вени, але не можуть повністю оточити дугуву артерію; 4 = агрегати лімфоцитів повністю оточують дугуву артерію без поляризації. Тубулоінтерстиційна (TI) інфільтрація: 0 = відсутність інфільтратів; 1 = від мінімальних до слабких TI-інфільтратів; 2 =

слабкі інфільтрати між 20 % канальців; 3 = від слабких до помірних інфільтратів між до >50 % канальців по всій корі нирки; 4 = помірні інфільтрати між і навколо > 50 % канальців по всій корі нирки. Бали запалення слинних залоз і суглобів базувалися на тих самих принципах, при цьому бал 0-4 вказував на збільшення інфільтратів усередині тканини.

5 Продукування слини

Для вимірювання продукування слинних залоз мишей спочатку заспокоювали за допомогою кисню/ізофлурану в невеликій ізолюючій камері. Після заспокоєння мишам і.р. вводили 30 мкл (60 мкг) пілокарпіну нітрату (Sigma). Через дві хвилини після ін'єкції попередньо зважені палички для догляду за дітьми (підрізані до ~1,5 см, ватний тампон плюс стрижень) поміщали в рот тварини за передніми зубами. Мишей поміщали на бік, щоб забезпечити можливість збору слини за щокою і всмоктування ватною паличкою. Через 8 хвилин палички забирали і зважували, щоб розрахувати чисту вагу слини.

ELISA

Рівні загальних IgG і IgM, що циркулюють, визначали за допомогою ELISA із застосуванням наборів eBioscience (кат. № 88-50400, 88-50470) згідно з інструкціями виробника.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:1	CD40 людини	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPT ACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLV SDCTEFTETECCLPCGESEFLDTWN RETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGT SETDTICTCEEGWHCTSEACESCV LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICE PCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTS CETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQD RLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVA KKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLP SNTAAPVQETLHGCQPVTDQEDGKE SRISVQERQ
SEQ ID NO:2	Константна ділянка Ig-гамма-1 людини	ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:3	Мутант константної ділянки Ig-гамма-1 людини	ASTKGPSVFPLAPSSK S TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:4	Константна ділянка каппа-ланцюга Ig людини	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
SEQ ID NO:5	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: Ab1 (мишаче) (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVS CAASGFTFSDYGMNWVRQAP EKGLEWIA YISGRSNIYYADTVKGRFTISR DNAKNTLFLQMTSLRSEDTAM YYCARSWGYFDVWGTTTVSS
SEQ ID NO:6	CDR1 важкого ланцюга: Ab1 (мишаче) Ab2 (мишаче) huAb1v1CDR2v1-huAb1v1CDR2v17 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v4 huAb1v3 Ab101 Ab102	GFTFSDYGMN
SEQ ID NO:7	CDR2 важкого ланцюга: Ab1 (мишаче) huAb1VH.1/VL.1 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v3 huAb1v4	YISSGRSNIYYADTVKG

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:8	CDR3 важкого ланцюга: Ab2 (мишаче) Ab1 (мишаче) huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v1CDR2v1-huAb1v1CDR2v17 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v2 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	SWG YFDV
SEQ ID NO:9	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: Ab1 (мишаче)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLL YWASTRESGVPDRFAGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAG TKLEIK
SEQ ID NO:10	CDR1 легкого ланцюга: Ab2 (мишаче) Ab1 (мишаче) huAb1VH1/VL.1 huAb1VH1A/VL.1 huAb1VH1A/VL.1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT
SEQ ID NO:11	CDR2 легкого ланцюга: Ab1 (мишаче) Ab2 (мишаче) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	WASTRES

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:12	CDR3 легкого ланцюга: Ab1 (мишаче) Ab2 (мишаче) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	QNDYTYPLT
SEQ ID NO:13	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1/VL.1A huAb1v2 huAb1v3	EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWVS YISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:14	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLNLSGNQKNYLTWFQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDY TYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:15	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v5 huAb1v4 huAb1v6	EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:16	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLNLSGNQKNYLTWFQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:17	CDR1 легкого ланцюга: huAb1v6 huAb1v3	KSSQSLLNLGNQKNYLT
SEQ ID NO:18	VL-ділянка huAb1v5 huAb1v2 (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLNLTGNQKNYLTWFQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:19	CDR1 легкого ланцюга: huAb1v5 huAb1v2	KSSQSLLNTGNQKNYLT
SEQ ID NO:20	Варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL): huAb1v1 Ab101 Ab102 (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLNLRGNQKNYLTWFQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYP LTFGQGTKLEIK

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:21	CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга: huAb1v1 Ab101 Ab102	KSSQSLLNRGNQKNYLT
SEQ ID NO:22	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v1 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:23	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v2 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:24	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v3 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:25	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v4 (CDR виділені жирним шрифтом) (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:26	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v5 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:27	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v6 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:28	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:29	VH-ділянка huAb1v1CDR2v8 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:30	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v9 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:31	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v10 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRDNIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVWGQGTTVTVSS

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:32	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v11 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRMNIYYADTVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:33	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v12 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYIS SGRKNIYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:34	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v13 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIA YISSGRHNIYYADTVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:35	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v14 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYIS SGRFNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:36	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v15 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSG RYNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGT TVTVSS
SEQ ID NO:37	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v16 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSG RANIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWGQGT TVTVSS
SEQ ID NO:38	Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH): huAb1v1CDR2v17 (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYIS SGRPNIYYADTVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVW GQGTTTVTVSS
SEQ ID NO:39	Послідовність важкого ланцюга Ab101 (константна ділянка підкреслена; CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYIS SGRGNIYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFD VWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:40	Послідовність легкого ланцюга Ab101 Послідовність легкого ланцюга Ab102 Гуманізоване (константна ділянка підкреслена; CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
SEQ ID NO:41	Послідовність важкого ланцюга Ab102 Гуманізоване (константна ділянка підкреслена; CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAIYIS SGRGNIIYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLR AEDTAVYYCARSWG YFD VWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAA GGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKG FYP SDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSL SPGK
SEQ ID NO:42	CDR2 важкого ланцюга: Ab2 huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102	YISSGRGNIYYADTVKG
SEQ ID NO:43	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb1v6 huAb1v3 (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNLGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGKLEIK
SEQ ID NO:44	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: Ab3 (мишаче) (CDR виділені жирним шрифтом)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAF GYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGY INPSSDYPNYNQKFKDKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWGYS FDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:45	Важкий ланцюг CDR1: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	GYTFTSYTMH

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:46	Важкий ланцюг CDR2: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	YINPSSDYPNYNQKFKD
SEQ ID NO:47	Важкий ланцюг CDR3: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	WGYSFDY
SEQ ID NO:48	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: Ab3 (мишаче) (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCRSSK SLLHSNGNTYLYWFLQRPQGSPQYLI YRMSTLASGVPDRFSGSGSGTAFTLR ISRVEAEDVGYYCMQHLEYPLTFGAG TKLELK
SEQ ID NO:49	Легкий ланцюг CDR1: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RSSKSLLHSNGNTYLY
SEQ ID NO:50	Легкий ланцюг CDR2: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RMSTLAS

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:51	Легкий ланцюг CDR3: Ab3 (мишаче) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	MQHLEYPLT
SEQ ID NO:52	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYI NPSSDYPNYNQKFKDRVITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYSGFD YWGQGTITVTVSS
SEQ ID NO:53	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYR MSTLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:54	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPS SDYPNYNQKFKDRVTLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARWGYSGFDYWGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO:55	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYT FTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSD YPNYNQKFKDRATLTADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARWGYSGFDYWGQGTITV TVSS
SEQ ID NO:56	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL LHSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLIYRMS TLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:57	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL LHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQYLIYRMS TLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE E DVG VYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:58	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v1	YISSGRNIIYYADTVKG
SEQ ID NO:59	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v2	YISSGRDNIYYADTVKG
SEQ ID NO:60	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v3	YISSGRENIYYADTVKG
SEQ ID NO:61	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v4	YISSGRRNIYYADTVKG
SEQ ID NO:62	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v5	YISSGRVNIYYADTVKG
SEQ ID NO:63	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v6	YISSGRLNIYYADTVKG

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:64	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v8	YISSGRINIYYADTVKG
SEQ ID NO:65	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v9	YISSGRQNIYYADTVKG
SEQ ID NO:66	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v10	YISSGRWNIYYADTVKG
SEQ ID NO:67	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v11	YISSGRMNIYYADTVKG
SEQ ID NO:68	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v12	YISSGRKNIYYADTVKG
SEQ ID NO:69	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v13	YISSGRHNIYYADTVKG
SEQ ID NO:70	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v14	YISSGRFNIYYADTVKG
SEQ ID NO:71	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v15	YISSGRYNIYYADTVKG
SEQ ID NO:72	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v16	YISSGRANIYYADTVKG
SEQ ID NO:73	CDR2 важкого ланцюга: huAb1v1CDR2v17	YISSGRPNIYYADTVKG
SEQ ID NO:74	CDR1 легкого ланцюга: huAb1v4	KSSQSLLNPGNQKNYLT
SEQ ID NO:75	Варіабельна ділянка важкого ланцюга: Ab2 (мишаче) (CDR виділені жирним шрифтом)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVS CAASGFTFSDYGMNWVRQ SPEKGLEWIAIYSSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSWGYFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:76	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: Ab2 (мишаче) (CDR виділені жирним шрифтом)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SSVQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:77	Варіабельна ділянка легкого ланцюга: huAb1v4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS LLNPGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO:78	Консенсусна послідовність CDR1 варіабельної ділянки важкого ланцюга	G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)
SEQ ID NO:79	Консенсусна послідовність CDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга	YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P) (Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K)(V/F)K(G/D)
SEQ ID NO:80	Консенсусна послідовність CDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга	(S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV
SEQ ID NO:81	Константна ділянка лямбда-ланцюга Ig людини	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:82	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH1-18&JH6 FR1 21/28&JH4 FR1	qvqlvqsgaevkkgasvkvscasgytft

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:83	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH1-18&JH6 FR2	wvrqapggglewmg

Ідентифікатор послідовності	Білок	Послідовність
SEQ ID NO:84	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH1-18&JH6 FR3	rvtmttdtststaymelrsrdsdtavyycar
SEQ ID NO:85	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH1-18&JH6 FR4 VH2-26&JH6 FR4 VH1-46&JH6 FR4	wgqgtvtvss
SEQ ID NO:86	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини 21/28&JH4 FR2	wvrqapggqrlewmg
SEQ ID NO:87	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини 21/28&JH4 FR3	rvtitrdtsastaymelsslrdsdtavyycar
SEQ ID NO:88	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини 21/28&JH4 FR4 M60&JH4 FR4	wgqgtltvss
SEQ ID NO:89	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH2-26&JH6 FR1	qvtlkesgpvlvkptetlttctvsgfsls
SEQ ID NO:90	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH2-26&JH6 FR2	wirqppgkalewlah
SEQ ID NO:91	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH2-26&JH6 FR3	rltiskdtsksqvvltmtnmdpvdtatyycar
SEQ ID NO:92	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини M60&JH4 FR1	qvtlresgpalvkptqtlitctlygfsls
SEQ ID NO:93	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини M60&JH4 FR2	wirqppgkalewla
SEQ ID NO:94	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини M60&JH4 FR3	rltiskdtsknqvvltmtnmdpvdtatyycar

Ідентифікатор послідовності	Блок	Послідовність
SEQ ID NO:95	Акцепторна послідовність важкого ланцюга людини VH1-46&JH6 FR3	rvtmtrdtststvymelsslrsestavyycar
SEQ ID NO:96	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A20&JK4 FR1	diquqtspsslsasvgdrvtic
SEQ ID NO:97	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A20&JK4 FR2	wyqqkpgkvpklliy
SEQ ID NO:98	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A20&JK4 FR3	gvpsrfsgsgsgtdftltisslqpedvatyyc
SEQ ID NO:99	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A20&JK4 FR4 III-3R&JK4 FR4 A1&JK4 FR4	fgggtkveikr
SEQ ID NO:100	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини III-3R&JK4 FR3	gvpsrisgsgsgtdftltisslqpediatyyc
SEQ ID NO:101	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A1&JK4 FR1	dvvmqtspslslpvtlgqpasisc
SEQ ID NO:102	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A1&JK4 FR2	wfqqrpgqsprrliy
SEQ ID NO:103	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини A1&JK4 FR3 01&JK2 FR3	gvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyc
SEQ ID NO:104	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини 01&JK2 FR1	divmtqtplslpvtpgepasisc
SEQ ID NO:105	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини 01&JK2 FR2	wylqkpgqspqlliy

Ідентифікатор послідовності	Блок	Послідовність
SEQ ID NO:106	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини 01&JK2 FR4	fgqgkcleikr

SEQ ID NO:107	Позаклітинний домен CD40 людини	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETECCLPCGES EFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQ QKGTSETDTICTCEE GW HCTSEACESCV
SEQ ID NO:108	Консенсусна послідовність CDR1 варіабельної ділянки легкого ланцюга	(K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)
SEQ ID NO:109	Консенсусна послідовність CDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга	(W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S
SEQ ID NO:110	Консенсусна послідовність CDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга	(Q/M)(N/Q)(D/H)(Y/L)(T/E)YPLT
SEQ ID NO: 111	CDR2 важкого ланцюга	YISSGRXNIYYADTVKG де "X" являє собою будь-яку амінокислоту, відмінну від T, D, V, L, I, M
SEQ ID NO: 112	CDR2 важкого ланцюга	YISSGRXNIYYADTVKG де "X" являє собою будь-яку амінокислоту
SEQ ID NO: 113	CDR1 легкого ланцюга	KSSQSLLNXGNQKNYLT де "X" не являє собою амінокислотний залишок Pro
SEQ ID NO: 114	Акцепторна послідовність легкого ланцюга людини III- 3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
SEQ ID NO: 115	Гістидинова мітка	His His His His His His

1411265ENUK_Sequences
ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<118> ABBVIE, INC.

<128> АНТИТІЛА ДО CD40 І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<138> 117813-10420

<148>

<141>

<158> 62/168,425

<151> 2015-05-29

<168> 117

<178> PatentIn версія 3.5

<218> 1

<211> 277

<212> Бинох

<213> Homo sapiens

<498> 1

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

1411265EMUK_Sequences

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 2

<211> 330

<212> Sinex

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1411265EMUR_Sequences

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 330

<212> Einox

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235	240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	

1411265ENUR_Sequences

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

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

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

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

<210> 4

<211> 106

<212> Elasm

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 116

1411255ENUK_Sequences

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

I411265FNUK_Sequences

<210> 7
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 7
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 8
 Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 9
 <211> 313
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

 <400> 9
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Met Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

I411265FNUK_Sequences

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 18

<211> 17

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 7

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 11

1411265ENUK_Sequences

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> Блок
<213> Штучна послідовність.

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 12
Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 13
<211> 116
<212> Блок
<213> Штучна послідовність.

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

14112655ENUK_Sequences

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 113

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 14

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 15

<211> 116

1411265EMUK_Sequences

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 113

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 16

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

1411265ENUK_Sequences

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
10 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 17

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 18

<211> 113

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

IA11265ENUK_Sequences

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 19
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 19
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

1411263ENUK_Sequences

Thr

<210> 20

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 20

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 21

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

1411265ENUK_Sequences

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 22

<211> 118

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

1411265ENUK_Sequences

<210> 23
 <211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24
 <211> 118
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

1411265EUK_Sequences

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 25

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

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 26

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

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

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

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

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

1411265EEM_Sequences

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 116

<212> Source

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка/ "Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

1411265EMUK_Sequences

Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 29

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

1411265EMUK_Sequences

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 30

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 30

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

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 31

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

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 34

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

1411265EMUK_Sequences

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 35

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

1411265EMUK_Sequences

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 36

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

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 37

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

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

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

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

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

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

1411265EMUK_Sequences

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 446

1411265EUK_Sequences

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

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

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

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

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

<210> 40

<211> 220

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

1411265EMUK_Sequences

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 41

<211> 446

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 41

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

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

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

1411265ENUK Sequences

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val		
	100	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
	115	125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
	130	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	165	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	180	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
	245	255

1411265ENUK Sequences

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 17

<212> БІЛАН

<213> Штучна послідовність

1411265CNUK_Sequences

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 42

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

Gly

<210> 43

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

1411265FNUK_Sequences

Lys

<210> 44

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 44

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

1411265EMBL Sequences

<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 45
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 46
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 46
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 47
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 47
Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 48
<211> 112
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser Val Ile Pro Gly
1 5 10 15

1411265ENUK_Sequences

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 40

<211> 16

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 40

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 50

Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

1411265ENUK_Sequences

<210> 51
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 51
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 52
 <211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

 <400> 52
 Glu 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 Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys 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 Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

1411265ENUK_Sequences

Thr Val Ser Ser
115

<210> 53

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 53

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

1411265ENUK_Sequences

<400> 54

Glu 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 Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys 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 Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 55

Glu 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 Thr Ser Tyr
20 25 30

1411265EMUK_Sequences

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 56

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 56

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

1411265ENUK_Sequences

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 57

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

1411265ENUK_Sequences

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 58
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 59
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 53
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 60
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 60
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 61
 <211> 17

1411265ENUK_Sequences

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 61

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

Gly

<210> 62

<211> 17

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 62

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

Gly

<210> 63

<211> 17

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 63

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

1411265ENUK_Sequences

<210> 64
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 64
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 65
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 65
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 66
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 66
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

1411265ENUK_Sequences

<210> 67
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 67
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 68
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 68
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 69
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

 <400> 69
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

1411265CNUK_Sequences

Gly

<210> 70

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 70

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 71

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 71

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 72

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<400> 72

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

1411265ENUK_Sequences

Gly

<210> 73
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
 <400> 73
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 74
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"
 <400> 74
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 75
 <211> 118
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"
 <400> 75

1411265EUNK_Sequences

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 76

<211> 113

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 76

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

1411265ENUK_Sequences

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 77

<211> 113

<212> 61808

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний поліпептид"

<400> 77

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

1411265ENUK_Sequences

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 98 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 78

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна послідовність"

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /заміна="Tyr"

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /заміна="Thr"

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /заміна="Ser"

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /заміна="Thr"

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /заміна="His"

<400> 78

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

1411265ENUK_Sequences

<210> 79
 <211> 17
 <212> Блок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна послідовність"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {3}..{3}
 <223> /заміна="Asn"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {4}..{4}
 <223> /заміна="Pro"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {5}..{6}
 <223> /заміна="Ser"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {7}..{7}
 <223> /заміна="Ser" або "Gly"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {8}..{8}
 <223> /заміна="Tyr"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {9}..{9}
 <223> /заміна="Pro"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {10}..{10}
 <223> /заміна="Asn"

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {12}..{12}
 <223> /заміна="Asn"

```

141126SEQUENCE_Sequences
<220>
<221> VARIANT
<222> {13}..{13}
<223> /заміна="Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> {14}..{14}
<223> /заміна="Lys"

<220>
<221> VARIANT
<222> {15}..{15}
<223> /заміна="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> {17}..{17}
<223> /заміна="Asp"

<480> 73
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1           5           10           15

Gly

<210> 88
<211> 7
<212> Білок
<213> Вуглецьна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис вуглецьної послідовності: Синтетична конденсація
послідовності"

<220>
<221> VARIANT
<222> {1}..{1}
<223> /заміна="Tyr"

<220>
<221> VARIANT
<222> {2}..{2}
<223> /заміна="Gly"

<220>
<221> VARIANT

```

1411265ENUK_Sequences

<222> (3)..(3)

<223> /samina="Tyr"

<220>

<221> BAPIAHT

<222> (4)..(4)

<223> /samina="Ser"

<400> 80

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 81

<211> 105

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 82

<211> 30

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

1411265ENUK_Sequences

<400> 82

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
20 25 30

<210> 83

<211> 14

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 83

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 84

<211> 32

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 85

<211> 11

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 86

<211> 14

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 86

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

1411265ENUK_Sequences

<210> 87

<211> 32

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 88

<211> 11

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 88

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 89

<211> 30

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 15

<212> Elnok

<213> Homo sapiens

<400> 90

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
1 5 10 15

<210> 91

<211> 32

<212> Elnok

1411265FNUK_Sequences

<213> Homo sapiens

<400> 91

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 92

<211> 30

<212> Blank

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 14

<212> Blank

<213> Homo sapiens

<400> 93

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 94

<211> 32

<212> Blank

<213> Homo sapiens

<400> 94

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 95

<211> 32

<212> Blank

I411265ENUK_Sequences

<213> Homo sapiens

<400> 95

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 96

<211> 23

<212> B1a0x

<213> Homo sapiens

<400> 96

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
20

<210> 97

<211> 15

<212> B1a0x

<213> Homo sapiens

<400> 97

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 98

<211> 32

<212> B1a0x

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 99

<211> 11

<212> B1a0x

1411265ENUK_Sequences

<213> Homo sapiens

<400> 99

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 100

<211> 32

<212> 61n0K

<213> Homo sapiens

<400> 100

Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 101

<211> 23

<212> 61n0K

<213> Homo sapiens

<400> 101

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 102

<211> 15

<212> 61n0K

<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 103

<211> 32

<212> 61n0K

<213> Homo sapiens

<400> 103

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1411265ENUK_Sequences

1 5 10 15

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

<210> 104
<211> 23
<212> Elnok
<213> Homo sapiens

<400> 104
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 105
<211> 15
<212> Elnok
<213> Homo sapiens

<400> 105
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 106
<211> 11
<212> Elnok
<213> Homo sapiens

<400> 106
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 107
<211> 100
<212> Elnok
<213> Homo sapiens

<400> 107
Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln
1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

1411265ENUK_Sequences

```

20                               25                               30
Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
 35                               40                               45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
 50                               55                               60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 65                               70                               75                               80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
 85                               90                               95

Glu Ser Cys Val
100

```

```

<210> 108
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<222> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна
послідовність"

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /заміна="Arg"

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /заміна="Lys"

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /заміна="His"

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)

```

```

1411265ENUK_Sequences
<223> /заміна=" "
<220>
<221> VARIANT
<222> {12}..(12)
<223> /заміна="Gly"
<220>
<221> VARIANT
<222> {13}..(13)
<223> /заміна="Asn"
<220>
<221> VARIANT
<222> {14}..(14)
<223> /заміна="Thr"
<220>
<221> VARIANT
<222> {17}..(17)
<223> /заміна="Tyr"
<400> 108
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1          5          10          15
Thr
<210> 109
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучка послідовність
<220>
<221> Джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна
послідовність"
<220>
<221> VARIANT
<222> {1}..(1)
<223> /заміна="Arg"
<220>
<221> VARIANT
<222> {2}..(2)
<223> /заміна="Met"

```


1411265EMK_Sequences

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /заміна="Leu"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(6)
<223> /заміна="Ala"

<400> 105
Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
1           5

<210> 110
<211> 9
<212> Nucle
<213> Вступна послідовність

<220>
<221> Джерело
<223> /примітка="Опис вступної послідовності: Синтетична консенсусна
послідовність."

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /заміна="Met"

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /заміна="Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /заміна="His"

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /заміна="Leu"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /заміна="Gln"

<400> 110

```

1411265EMBL Sequences

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 111

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<220>

<221> МОДИФІКОВАНІ_ЗАЛИШКИ

<222> {7}..(7)

<223> Будь-яка амінокислота, відмінна від Thr, Asp, Val, Leu, Ile або Met

<400> 111

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 112

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<220>

<221> МОДИФІКОВАНІ_ЗАЛИШКИ

<222> {7}..(7)

<223> Будь-яка амінокислота

<400> 112

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

1411265EMUK_Sequences

<210> 113
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<220>
 <221> МОДИФІКОВАНІ_ЗАЛИШКИ
 <222> (9)..(9)
 <223> Будь-яка амінокислота, відмінна від Pro

<400> 113
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 114
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 115
 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична мітка 6xHis"

<400> 115
 His His His His His His
 1 5

<210> 116
 <211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

1411265EUK_Sequences

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна послідовність"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {18}..(18)
 <223> /заміна="Met" або "Lys"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {24}..(24)
 <223> /заміна="Arg"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {27}..(27)
 <223> /заміна="Lys"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {31}..(31)
 <223> /заміна="His"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {33}..(33)
 <223> /заміна=" "

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {35}..(35)
 <223> /заміна="Gly"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {36}..(36)
 <223> /заміна="Asn"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {37}..(37)
 <223> /заміна="Thr"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> {40}..(40)
 <223> /заміна="Tyr"

1411263EFWJL_sequences

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (56)...(56)
<223> /zamina="Arg"

<220>
<221> VARIANT
<222> (57)...(57)
<223> /zamina="Met"

<220>
<221> VARIANT
<222> (58)...(58)
<223> /zamina="Leu"

<220>
<221> VARIANT
<222> (61)...(61)
<223> /zamina="Ala"

<220>
<221> VARIANT
<222> (66)...(66)
<223> /zamina="Met"

<220>
<221> VARIANT
<222> (96)...(96)
<223> /zamina="Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> (97)...(97)
<223> /zamina="His"

<220>
<221> VARIANT
<222> (98)...(98)
<223> /zamina="Leu"

<220>
<221> VARIANT
<222> (99)...(99)
<223> /zamina="Glu"

<400> 118
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1. 5. 10. 15.

Glu Ser Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20. 25. 30.

```

1411285EMM8_sequences

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 117

<211> 116

<212> Блок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетична консенсусна послідовність"

<220>

<221> VARIANT

<222> {27}...(27)

<223> /заміна="Tyr"

<220>

<221> VARIANT

<222> {30}...(30)

<223> /заміна="Thr"

<220>

<221> VARIANT

<222> {31}...(31)

<223> /заміна="Ser"

1411265EUK_Sequences

```

<220>
<221> VARIANT
<222> {33}..(33)
<223> /заміна="Thr"

<220>
<221> VARIANT
<222> {35}..(35)
<223> /заміна="His"

<220>
<221> VARIANT
<222> {52}..(52)
<223> /заміна="Asn"

<220>
<221> VARIANT
<222> {53}..(53)
<223> /заміна="Pro"

<220>
<221> VARIANT
<222> {54}..(54)
<223> /заміна="Ser"

<220>
<221> VARIANT
<222> {55}..(55)
<223> /заміна="Ser"

<220>
<221> VARIANT
<222> {56}..(56)
<223> /заміна="Ser" або "Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> {57}..(57)
<223> /заміна="Tyr"

<220>
<221> VARIANT
<222> {58}..(58)
<223> /заміна="Pro"

<220>
<221> VARIANT
<222> {59}..(59)
<223> /заміна="Asn"

<220>
<221> VARIANT

```

1411265EMBL_Sequences

```

<222> {61}..{61}
<223> /заміна="Asn"

<220>
<221> VARIANT
<222> {62}..{62}
<223> /заміна="Gln"

<220>
<221> VARIANT
<222> {63}..{63}
<223> /заміна="Lys"

<220>
<221> VARIANT
<222> {64}..{64}
<223> /заміна="Phe"

<220>
<221> VARIANT
<222> {66}..{66}
<223> /заміна="Asp"

<220>
<221> VARIANT
<222> {99}..{99}
<223> /заміна="Trp"

<220>
<221> VARIANT
<222> {100}..{100}
<223> /заміна="Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> {101}..{101}
<223> /заміна="Tyr"

<220>
<221> VARIANT
<222> {102}..{102}
<223> /заміна="Ser"

<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15

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

```


1411265EMBL Sequences

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
 100 105 110

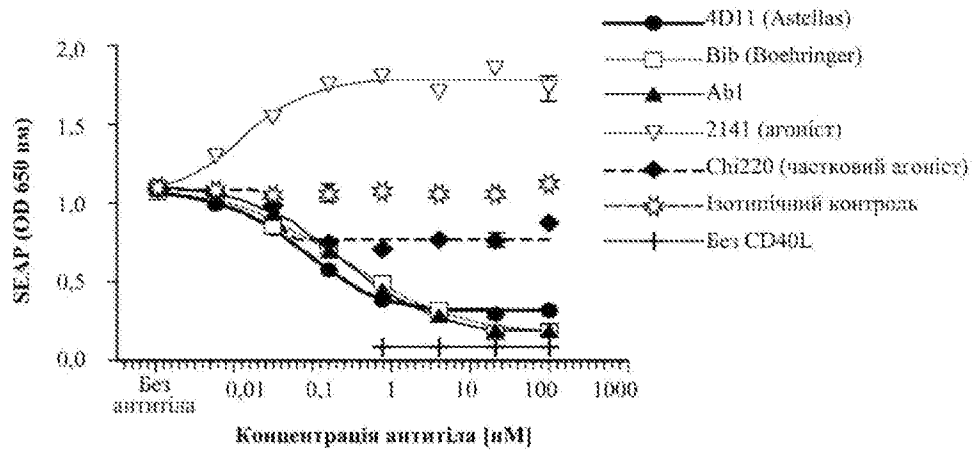
Thr Val Ser Ser
 115

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло до CD40, яке містить:
 важкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 41, і
 легкий ланцюг, який містить амінокислотну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 40.
2. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло до CD40 за п. 1 і фармацевтично
 прийнятний носій.
- 10 3. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує амінокислотну послідовність антитіла до CD40 за п.
 1.
4. Вектор, який містить виділену нуклеїнову кислоту за п. 3.
5. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 4.
6. Клітина-хазяїн за п. 5, де клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною або еукаріотичною
 клітиною.
- 15 7. Клітина-хазяїн за п. 6, де клітина-хазяїн є клітиною CHO або клітиною COS.
8. Спосіб одержання антитіла до CD40, який включає стадію культивування клітини-хазяїна за
 будь-яким із пп. 5-7 у середовищі для культивування в умовах, придатних для вироблення
 антитіла до CD40.

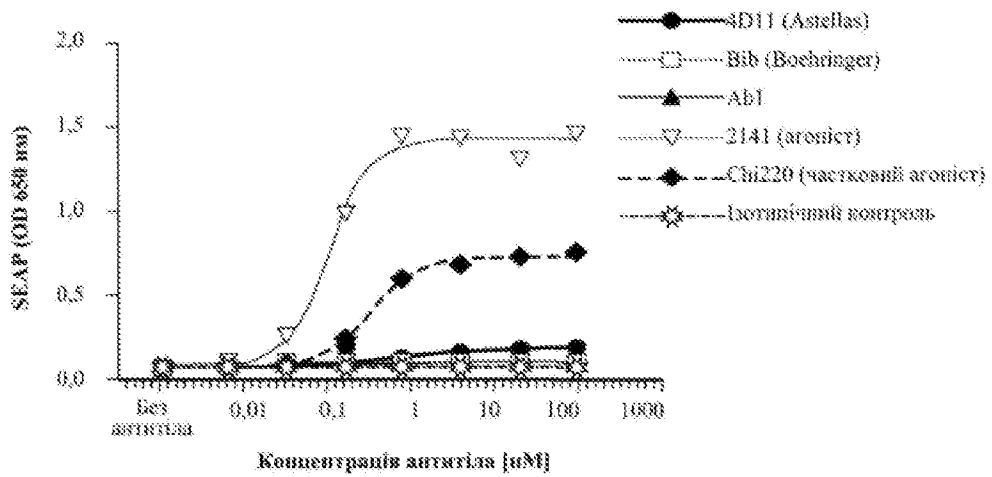
Фіг. 1А

Аналіз на агоністичну активність

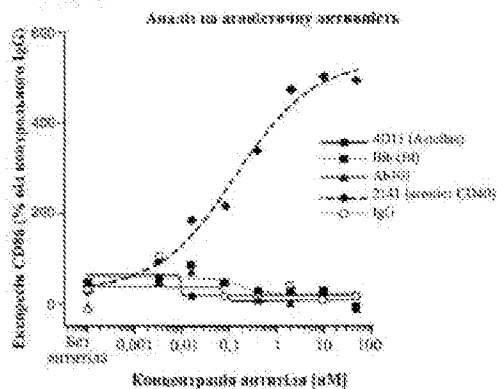


Фіг. 1В

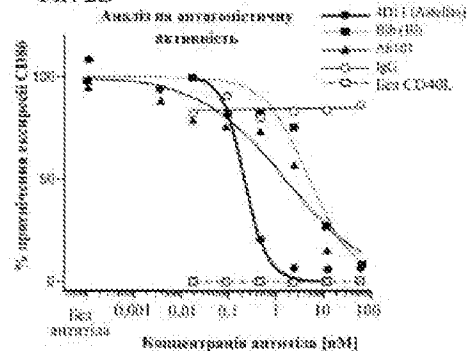
Аналіз на агоністичну активність



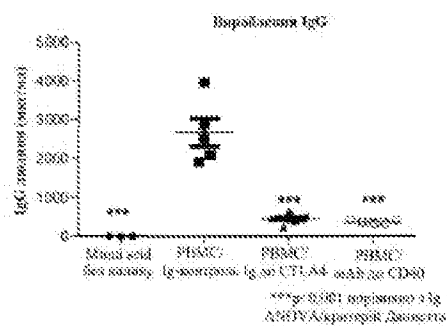
Фиг. 2А



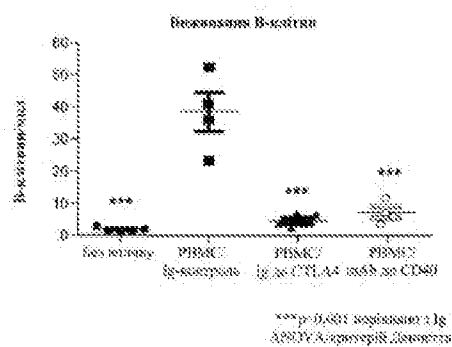
Фиг. 2В



Фиг. 3А



Фиг. 3В



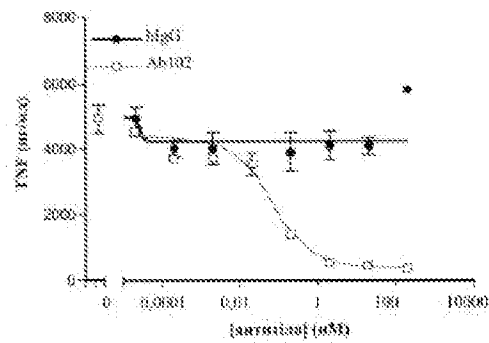
Фиг. 4A

		1	50
Ab3 SEQ ID NO:48	(1)	DIIVMTQAAPEVGVIPGESVSISCRSSKSLIHS-NGNTYLYWFLQRFQGSF	
Ab1 SEQ ID NO:9	(1)	DIIVMTQSPFSLVTVAGENVTHSCKSSQSLINSGNQKHYLTNFGQKPFQGSF	
Ab2 SEQ ID NO:76	(1)	DIIVMTQSPFSLVTVAGENVTHSCKSSQSLINSGNQKHYLTNFGQKPFQGSF	
Консервация последовательности	(1)	DIIVMTQSPFSLVTVAGENVTHSCKSSQSLINSGNQKHYLTNFGQKPFQGSF	
		R K H - GNT Y	
		51	100
Ab3	(50)	QVLIYRMSTLASGVPEPFGSGSGCTAFTLRISRVEARINQVYVCMQHLEY	
Ab1	(51)	KLLIYWASTRESGVPEPFGSGSGCTAFTLTISSEVQADILAVYVCQNDITY	
Ab2	(51)	KLLIYWASTRESGVPEPFGSGSGCTAFTLTISSEVQADILAVYVCQNDITY	
Консервация последовательности	(51)	KLLIYWASTRESGVPEPFGSGSGCTAFTLTISSEVQADILAVYVCQNDITY	
		RM LA	MQHLE
		101	
Ab3	(100)	PLTFEAGTKIELK	
Ab1	(101)	PLTFEAGTKIELK	
Ab2	(101)	PLTFEAGTKIELK	
Консервация последовательности	(101)	PLTFEAGTKIELK	

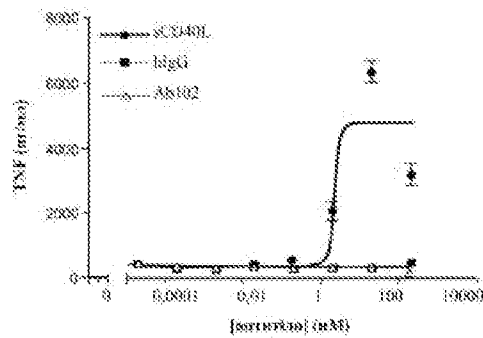
Фиг. 4B

		1	50
Ab3 SEQ ID NO:44	(100)	EVQLVESGGGLVAPGASVMECKAPGYTFSTYIMHWVRQAPFEGLEWIA	
Ab1 SEQ ID NO:5	(101)	EVQLVESGGGLVAPGASVMECKAPGYTFSTYIMHWVRQAPFEGLEWIA	
Ab2 SEQ ID NO:75	(101)	EVQLVESGGGLVAPGASVMECKAPGYTFSTYIMHWVRQAPFEGLEWIA	
Консервация последовательности	(101)	EVQLVESGGGLVAPGASVMECKAPGYTFSTYIMHWVRQAPFEGLEWIA	
		Y TS T H	
		51	100
Ab3	(100)	INPSSDYPNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFCARWG	
Ab1	(101)	ISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQNTSLRSEDTAMYYCARSW	
Ab2	(101)	ISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQNTSLRSEDTAMYYCARSW	
Консервация последовательности	(101)	ISSGR NIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQNTSLRSEDTAMYYCARSW	
		NPSS YFN NQKF D	WG
		101	
Ab3	(200)	YSFDYWGCTGTTTVSGE	
Ab1	(201)	GYFDVWGCTGTTTVSGE	
Ab2	(201)	GYFDVWGCTGTTTVSGE	
Консервация последовательности	(201)	GYFDVWGCTGTTTVSGE	
		YS	

Фиг. 5А

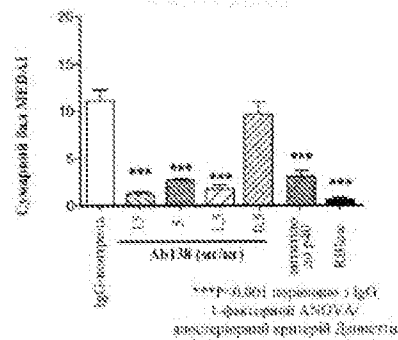


Фиг. 5В



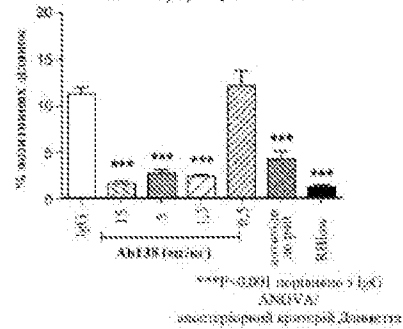
Фиг. 6

Влияние на продукцию аутоантител CD48 и TCT
Доза 30, членик 6а

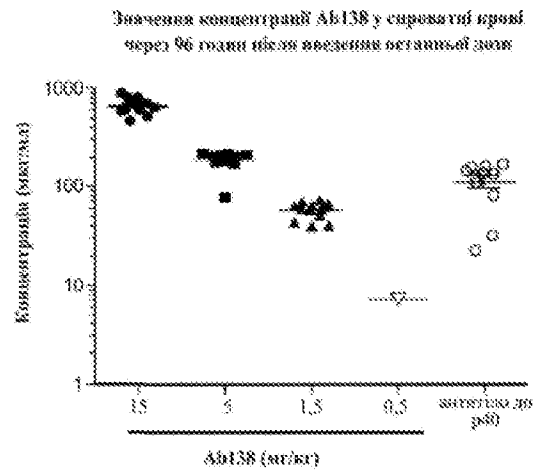


Фиг. 7

Влияние на продукцию TCT-3612
RAF макрофагов у мышей линии

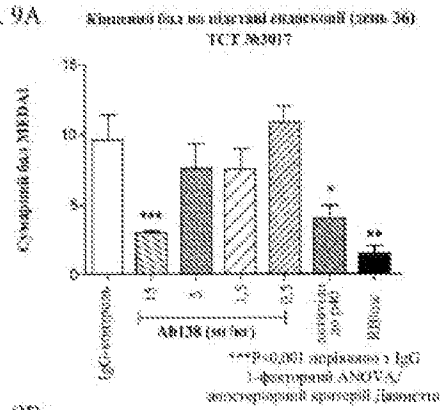


Фіг. 8

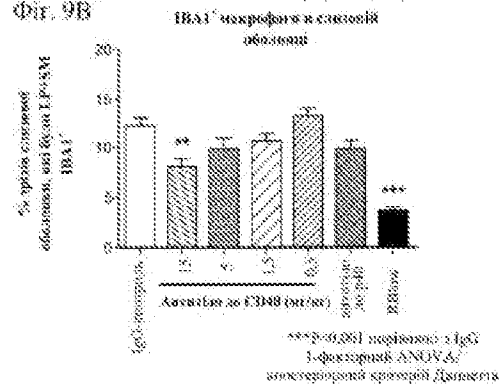


Тільки в 1 тварині в групі з дозою 0,5 мг/кг були вимірювані рівні Ab138

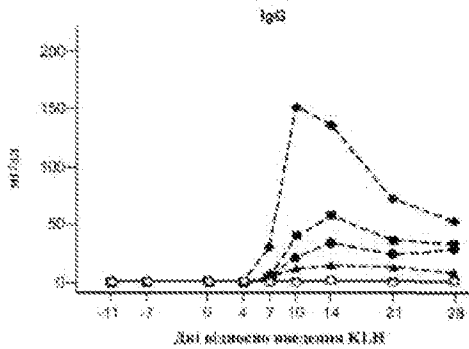
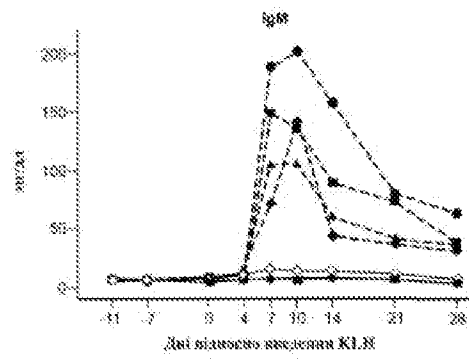
Фіг. 9A



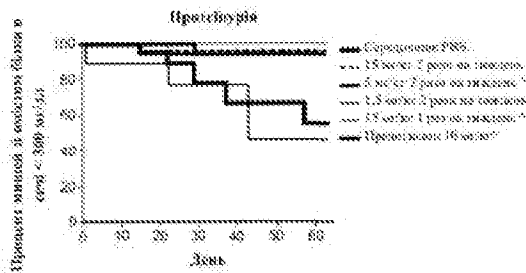
Фіг. 9B



Фиг. 10



Фиг. 11А

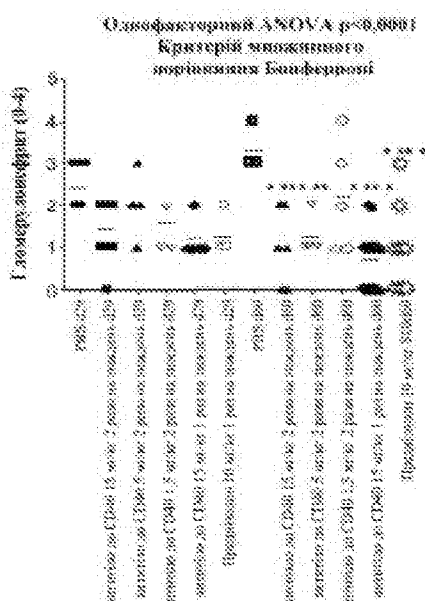


Фиг. 11В

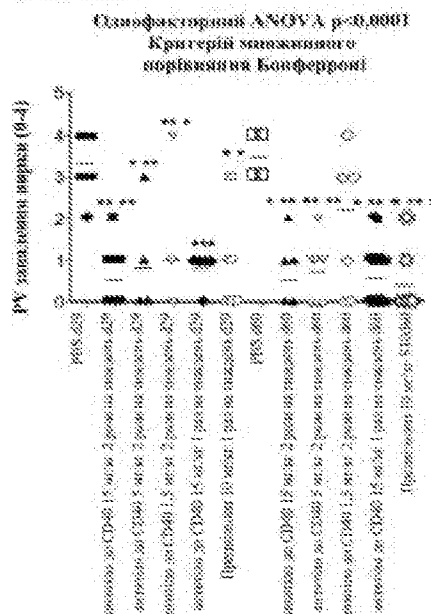


*p-значение < 0.05 для независимости
 Регрессионный ранговый критерий Манн-Уитни
 Препараты являются плацебо-контролем

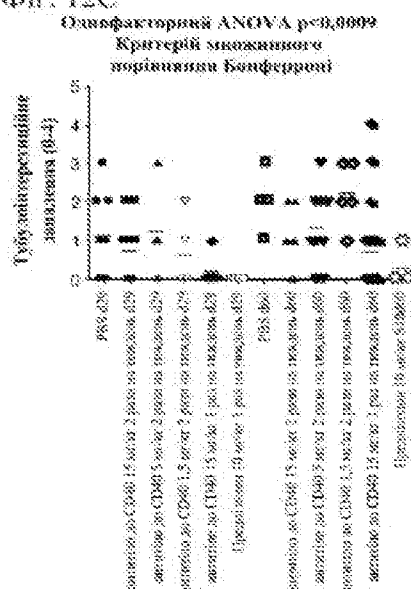
Фіг. 12А



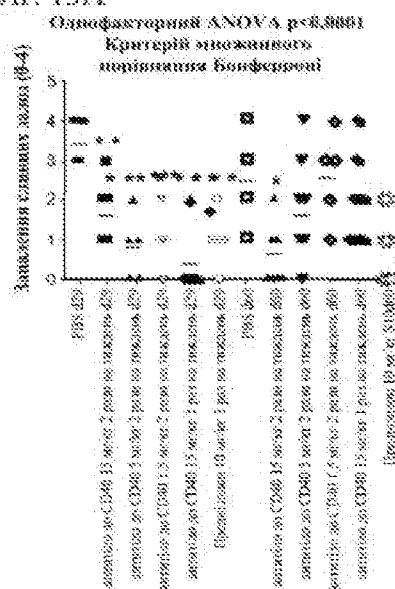
Фіг. 12В



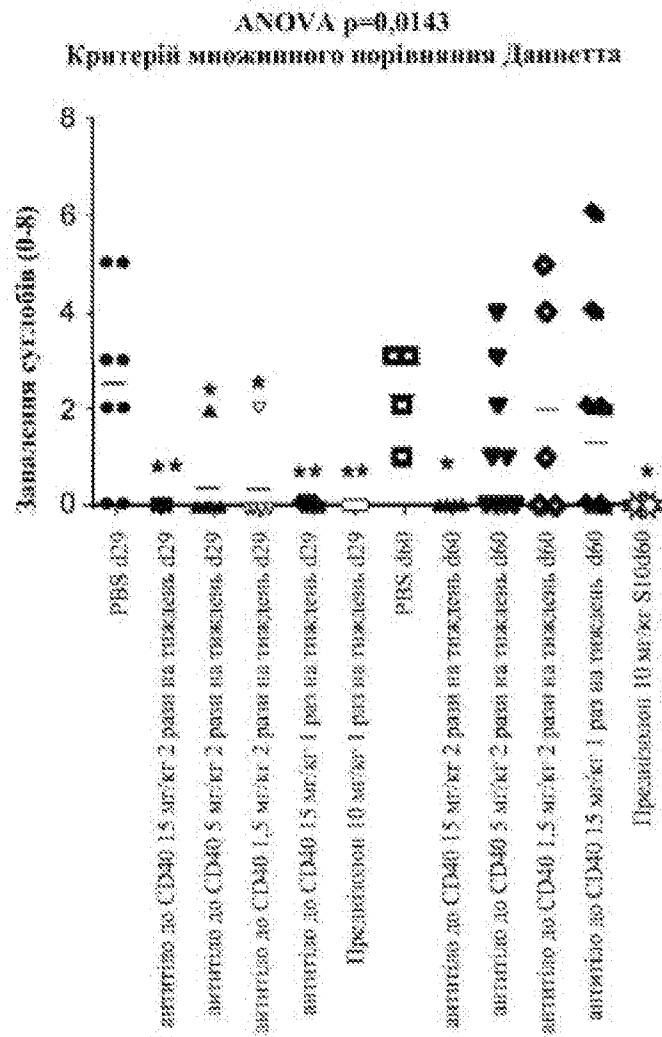
Фіг. 12С



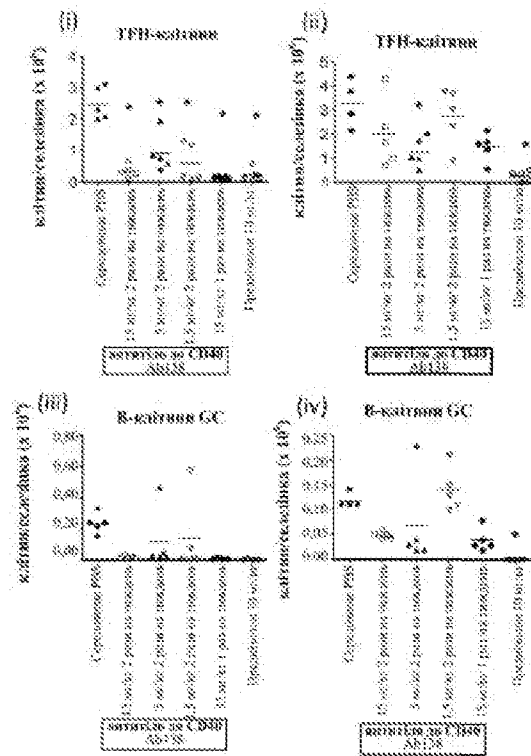
Фіг. 13А



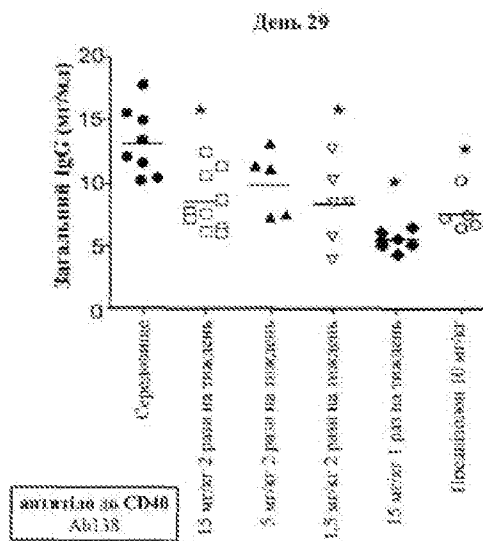
Φir. 13B



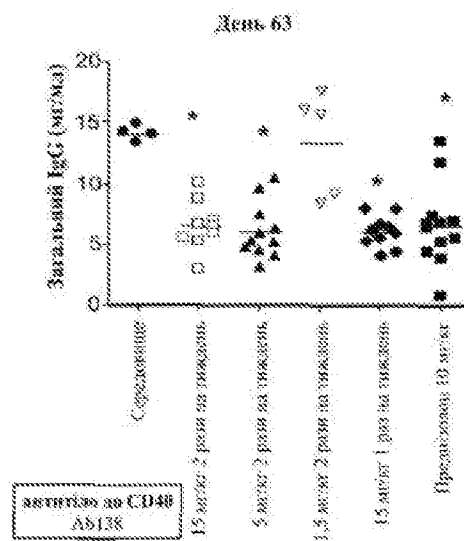
Фіг. 14



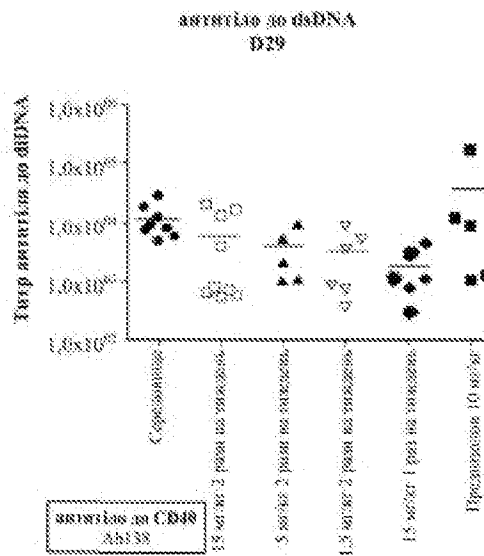
Фіг. 15A



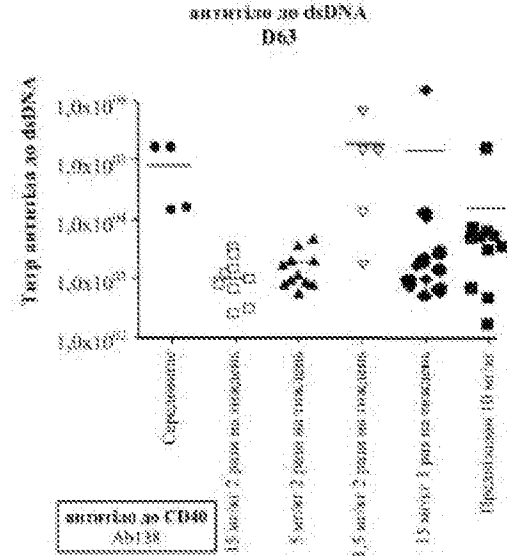
Фіг. 15B



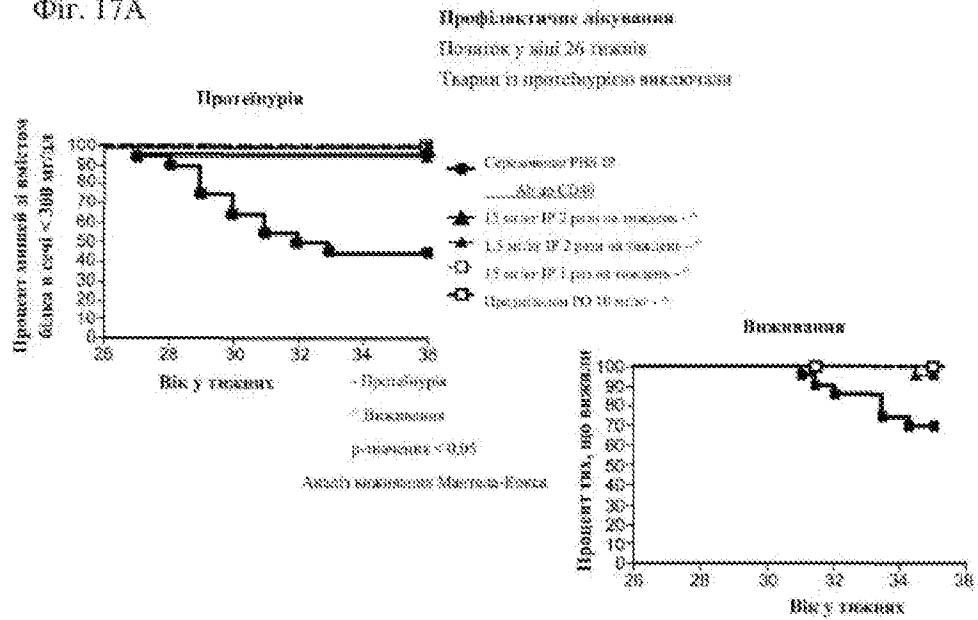
Фіг. 16A



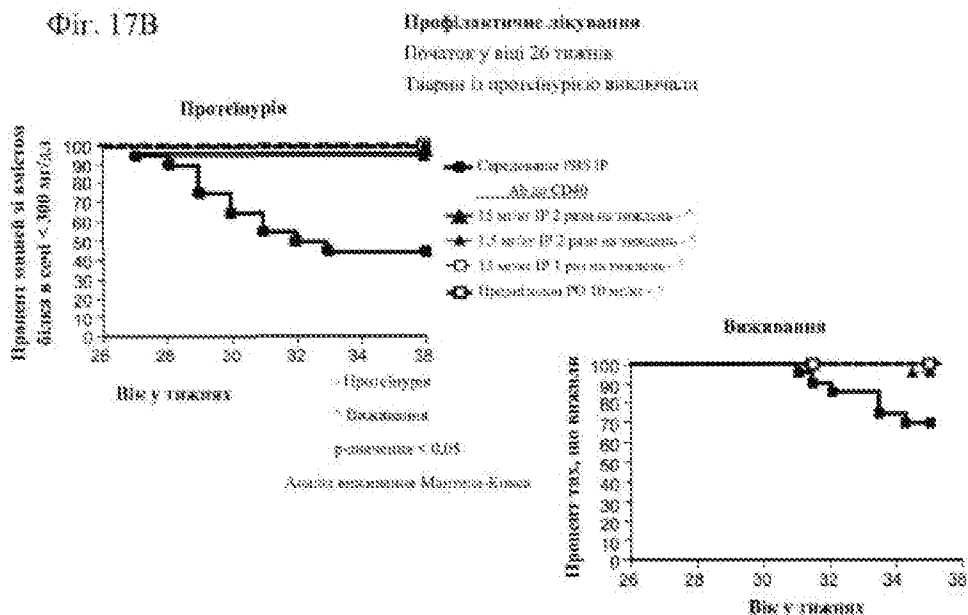
Фіг. 16B



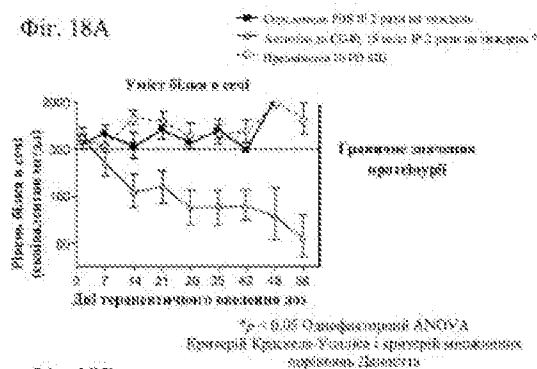
Фіг. 17A



Фіг. 17В



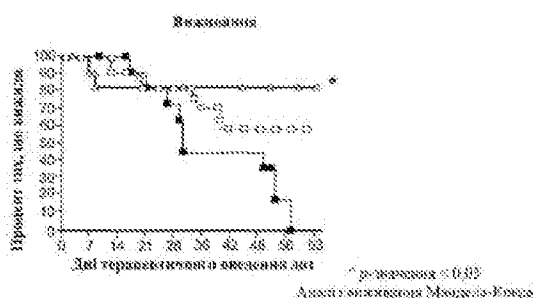
Фіг. 18А



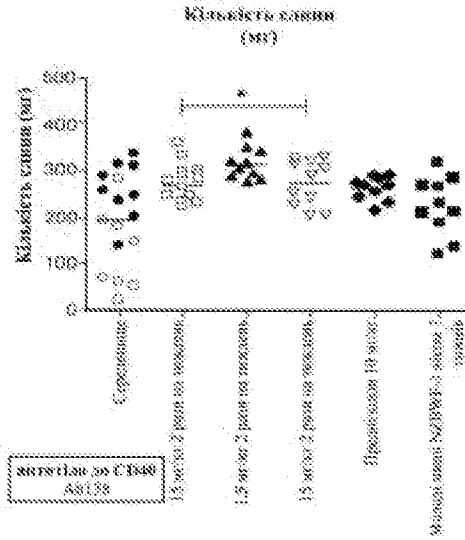
Фіг. 18В



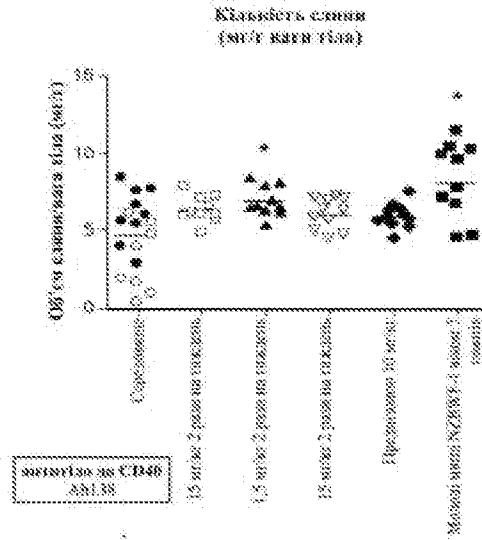
Фіг. 18С



Фіг. 19А

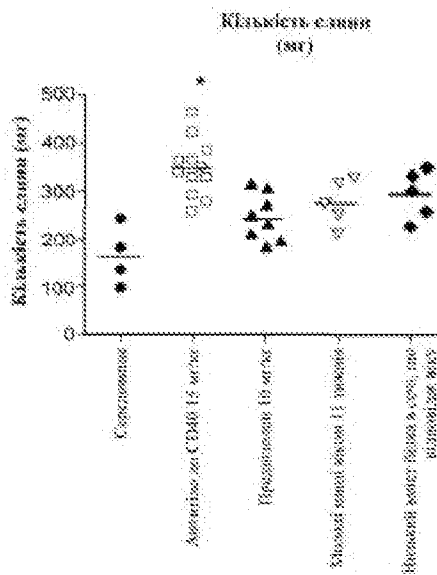


Фіг. 19В



Білі кола в групі контролю середовищем – мийки із протектиурієм

Фіг. 20А



Фіг. 20В

