

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **031872**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(21) Номер заявки
201201357

(22) Дата подачи заявки
2011.03.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО К CD40, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТО АНТИТЕЛО, И ВЫДЕЛЕННЫЙ ПОЛИНУКЛЕОТИД, КОДИРУЮЩИЙ ЕГО

(31) **61/319,574**

(32) **2010.03.31**

(33) **US**

(43) **2013.04.30**

(86) **PCT/US2011/030427**

(87) **WO 2011/123489 2011.10.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(56) **WO-A2-2007124299**

US-A1-2003165499

WO-A2-2007129895

US-A1-2004120948

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE (LANDMARK EDITION), FRONTIERS IN BIOSCIENCE, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP002614477, ISSN: 1093-4715, the whole document

(72) Изобретатель:

**Барретт Рейчел, Бродьюр Скотт,
Кэнеде Кейт А., Литценбургер Тобиас,
Сингх Санджая (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)**

(57) В изобретении описаны новое гуманизированное антагонистическое антитело к CD40, которое содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 17; а также последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 25; применение его для лечения или облегчения заболевания или нарушения у млекопитающего, выбранного из группы, включающей реакцию "трансплантат-против-хозяина", аутоиммунное или воспалительное заболевание и связанное с CD40 нарушением; фармацевтическая композиция, содержащая это антитело, и выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность тяжелой цепи или варибельной области этой цепи или аминокислотную последовательность легкой цепи или варибельную область этой цепи антитела.

B1**031872****031872****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится в целом к гуманизированным антителам к CD40, предназначенным для диагностического и терапевтического применения. Более конкретно, в изобретении предложены гуманизированные антитела к CD40 и его применение для лечения различных заболеваний или нарушений, которые отличаются присутствием клеток, экспрессирующих CD40. Описаны также фармацевтические композиции, которые содержат гуманизированное антитело к CD40, а также выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность тяжелой цепи или варибельной области тяжелой цепи, или аминокислотную последовательность легкой цепи и варибельную область легкой цепи указанных антител.

Предпосылки создания изобретения

CD40 представляет собой имеющий молекулярную массу 48 кДа интегральный мембранный гликопротеин типа I, и он является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). CD40 экспрессируется на широком разнообразии клеточных типов, включая здоровые и неопластические В-клетки, интердигитатные (переплетенные) клетки, клетки карциномы, эпителиальные клетки (например, кератиноциты), фибробласты (например, синовиоциты) и тромбоциты. Он присутствует также на моноцитах, макрофагах, некоторых типах эндотелиальных клеток и фолликулярных дендритных клетках. Для CD40 характерна экспрессия на ранней стадии онтогенеза В-клеток, он появляется на предшественниках В-клеток после появления CD10 и CD19, но перед экспрессией CD21, CD23, CD24 и появлением поверхностного иммуноглобулина М (sIgM) (Uckun и др., Blood 15, 1990, с. 2449). CD40 выявлен также на миндалинах и продуцируемых костным мозгом плазматических клетках (Pellat-Descomynck и др., Blood 84, 1994, с. 2597).

Лигандом CD40 является CD40L (который обозначают также как CD154, gp39 и TRAP), представитель суперсемейства TNF. CD40L представляет собой трансмембранный белок, который экспрессируется главным образом на активированных CD4⁺-Т-клетках и небольшой подпопуляции CD8⁺-Т-клеток (см. обзор Van Kooten С. и Banchereau, 2000).

Взаимодействие CD40 с CD40L индуцирует как гуморальные, так и клеточно-опосредованные ответы. CD40 регулирует осуществляемую этой парой лиганд-рецептор активацию В-клеток и других антигенпрезентирующих клеток (АПК), включая дендритные клетки (ДК) (см., обзор (Toubi и Shoenfeld, 2004); (Kiener и др., 1995)). Были проведены обширные исследования функции CD40 на В-клетках. Активация CD40 на В-клетках индуцирует пролиферацию, дифференцировку в секретирующие антитела клетки и переключение изотипа в герминативных (зародышевых) центрах вторичных лимфоидных органов. Опыты *in vitro* продемонстрировали непосредственные воздействия активации CD40 на производство цитокинов (IL-6, IL-10, TNF- α , LT- α), экспрессию молекул адгезии и костимулирующих рецепторов (ICAM, CD23, CD80 и CD86) и повышенную экспрессию молекул ГКГ класса I, ГКГ класса II и TAP-транспортера В-лимфоцитами (Liu и др., 1996). В большинстве указанных процессов CD40 действует либо совместно с другими цитокинами, либо в сочетании с другими взаимодействиями рецептор-лиганд.

Передача сигналов CD40 на моноцитах и ДК приводит к повышенной выживаемости, а также к секретиции цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α и MIP-1 α). Сшивание CD40 с этими АПК приводит также к повышающей регуляции костимулирующих молекул (таких как ICAM-1, LFA-3, CD80 и CD86). Активация CD40-рецепторов является одним из имеющих решающее значение сигналов, которые приводят к полному созреванию ДК в эффективные АПК, обеспечивающие Т-клеточную активацию (Banchereau и Steinman, 1998) (Van Kooten С. и Banchereau, 2000).

В современных исследованиях на мышиных моделях установлено, что передача сигналов CD40 на дендритных клетках играет также важную роль в создании TH17-клеток, которые считаются медиаторами аутоиммунитета при таких болезнях как артрит и рассеянный склероз (Iezzi и др., 2009) (Perona-Wright и др., 2009).

Наличие мышей с "выключенными" CD40 и CD40L, а также агонистических и антагонистических антимышиных антител создает возможность изучать роль взаимодействий CD40-CD40L на нескольких моделях заболеваний. Продemonстрировано благоприятное действие применения блокирующего антитела к CD40L при исследовании на нескольких моделях аутоиммунитета, включая спонтанные заболевания типа волчаночного нефрита у SNF1-мышей или диабета у NOD-мышей, или на экспериментально индуцированных формах болезней типа индуцированного коллагеном артрита (CIA) или экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) (Toubi и Shoenfeld, 2004). Было выявлено ингибирование CIA у мышей, обусловленное МАт к CD40L, которое блокировало развитие воспаления суставов, титры сывороточных антител к коллагену, инфильтрацию воспалительных клеток в субсиновиальную ткань, а также эрозию хряща и кости (Durie и др., 1993). Было продемонстрировано, что как при волчаночном нефрите, так и при EAE антитело к CD40L обладало также способностью купировать начало болезни, что подтверждает роль CD40-CD40L на эффекторной фазе болезни (Kalled и др., 1998); (Howard и др., 1999).

Роль взаимодействий CD40-CD40L изучена также в отношении EAE на мышях с дефицитом CD40L, которые несли трансгенный Т-клеточный рецептор, специфический в отношении основного белка миелина. У этих мышей не развивался EAE после примирования антигеном, и CD4⁺-Т-клетки оставались в покое и не продуцировали INF- γ (Grewal и др., 1996).

Кроме того, для обладающих ингибирующим действием антител к CD40 продемонстрировано их благоприятное воздействие на моделях воспалительных заболеваний, таких как EAE. Lamann с коллегами продемонстрировали, что антагонистическое мышиное МАт к человеческому CD40 mu5D12 и химерная версия этого МАт эффективно предупреждали клиническое проявление хронического демиелинизирующего ЕАЕ у аутобредных обезьян мармозеток (игрунки) (Laman и др., 2002); (Boon и др., 2001). Последующее исследование продемонстрировало, что терапевтическое лечение с использованием химерного антитела к человеческому CD40 снижало выявляемое с помощью ЯМР-томографии воспаление и замедляло увеличение ранее существующих повреждений головного мозга на созданной на мармозетках модели ЕАЕ (Hart и др., 2005).

Антитела к CD40, обладающие агонистической активностью, изучали на мышиных моделях артрита, при этом были получены в определенной степени противоречивые результаты. Как и следовало ожидать для иммуностимулирующего агента, на созданной на мышях DBA/1 модели CIA было установлено, что агонистическое антимышиное МАт к CD40 FGK45 обостряло заболевание (Tellander и др., 2000). Однако при использовании другой модели хронического CIA было установлено, что FGK45 и другое агонистическое антимышиное МАт CD40, 3/23, оба оказывали положительные терапевтические воздействия (Mauri и др., 2000). Данная группа исследователей высказала предположение о том, что агонистические антитела при их применении согласно указанной терапевтической схеме лечения оказывали благоприятное воздействие в результате индукции сдвига иммунного ответа в сторону Th2-ответа, что сопровождалось пониженными уровнями IFN- γ и повышенными уровнями IL-4 и IL-10 (Mauri и др., 2000).

Опубликованы также данные о предупреждении отторжения трансплантата путем блокирования взаимодействий CD40/CD154. В опытах по аллотрансплантации почек макакам-резус было продемонстрировано, что при применении ch5D12, представляющего собой химерное антагонистическое антитело к CD40, антагонизм в отношении CD40 оказался достаточным для модификации заболевания, и применение антитела обеспечивало удлинение среднего времени жизни, составляющее более 100 дней. Когда ch5D12 объединяли с антителом к CD86 и применяли только в начале опытов по аллотрансплантации, после чего осуществляли длительное лечение циклоспорином, то достигали среднего времени жизни, превышающего 4 года, это свидетельствует о том, что указанная комбинация потенциально может индуцировать переносимость (Haanstra и др., 2005).

Таким образом, известно достаточное количество доклинических исследований, которые свидетельствуют о решающей роли диады CD40-CD40L в обеспечении эффективного зависящего от Т-клеток иммунного ответа. Следовательно, блокирование передачи сигналов CD40 рассматривается как приемлемая и нужная терапевтическая стратегия подавления патогенного аутоиммунного ответа при таких болезнях как РА (ревматоидный артрит), рассеянный склероз или псориаз. Однако к настоящему времени отсутствуют антитела к CD40, разрешенные для терапевтического вмешательства при указанных нарушениях из-за сведений о том, что ранее разработанные антитела к CD40 обладают выраженными побочными действиями. Таким образом, сохраняется выраженная потребность в терапевтических средствах, которые можно применять для вмешательства в действие CD40-CD40L и блокирования передачи сигналов CD40. Эту задачу можно решать с помощью новых гуманизированных антител к CD40, которые специфически связываются с CD40 и обладают специфичностью связывания антигена, аффинностью и фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, позволяющими применять их для терапевтического вмешательства при связанных с CD40 нарушениях.

Краткое изложение сущности изобретения

Первым объектом данного изобретения является гуманизированное антитело к CD40, которое содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 17; а также последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 25.

Причем в предпочтительном варианте осуществления это гуманизированное моноклональное антитело содержит тяжелую и легкую цепь с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно или же вариативную область тяжелой цепи и вариативную область легкой цепи с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 52 соответственно.

Другим объектом данного изобретения является применение предложенного антитела для лечения или облегчения заболевания или нарушения у млекопитающего, причем заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей реакцию "трансплантат-против-хозяина", аутоиммунное или воспалительное заболевание и связанное с CD40 нарушение.

В предпочтительном варианте заявленного применения аутоиммунное или воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей ревматоидный артрит, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, пролиферативный волчаночный гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), псориаз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), болезнь Крона и системную красную волчанку (SLE), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреотоксикоз/болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный кардит, болезнь Аддисона, преждевременную менопаузу, сахарный диабет типа 1, синдром Гудпасчера, тяжелую псевдопаралитическую

миастению, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую лейкопению, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит (отрицательный по Ag HBs), криптогенный цирроз, синдром Шегрена, дерматомиозит, склеродерму, смешанную соединительнотканную болезнь, дискоидную красную волчанку и системный васкулит.

Возможно также применение заявленного антитела со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, включающей антагонист TNF, модифицирующее заболевание противоревматоидное средство, антагонист CTLA4, МАт к рецептору IL-6 и МАт к CD20.

Это антитело можно вводить парентеральным путем, внутривенным путем или подкожным путем введения.

Третьим объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения или облегчения заболевания или нарушения у млекопитающего, которое выбрано из группы, включающей реакцию "трансплантат-против-хозяина", аутоиммунное или воспалительное заболевание и связанное с CD40 нарушение. Эта композиция содержит описанное в заявке антитело фармацевтически приемлемый эксципиент.

В предпочтительном варианте осуществления этого изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано/конъюгирован со вторым средством, причем указанное второе средство является цитотоксическим агентом, ПЭГ-носителем, ферментом или маркером.

И, наконец, последним объектом, который описан в данной заявке, является выделенный полипептид, кодирующий аминокислотную последовательность тяжелой цепи или варибельной области тяжелой цепи, или аминокислотную последовательность легкой цепи и варибельную область легкой цепи заявленного антитела, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 35, а аминокислотная последовательность легкой цепи содержит SEQ ID NO: 31; или аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, а аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 52.

Краткое описание некоторых аспектов чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - А: кривые связывания и соответствующие значения EC_{50} гуманизированных антител с трансфектированными CD40 НЕК-293-клетками, для определения которых применяли проточную цитометрию. Б. Сравнение связывания антитела А, антитела В и антитела С с трансфектированными CD40 НЕК-клетками, которое определяли с помощью проточной цитометрии. Представлены репрезентативные данные, полученные в одном эксперименте;

на фиг. 2 - кривые связывания и соответствующие значения EC_{50} гуманизированных антител с RA-MOS-клетками, для определения которых применяли проточную цитометрию. Представлены репрезентативные данные, полученные в одном эксперименте;

на фиг. 3 - данные оценки антагонистической активности мышиных и гуманизированных антител, полученные с помощью анализа пролиферации первичных В-клеток. (А) Представлены репрезентативные кривые титрования антител и полученные значения IC_{50} для каждого мышиного антитела-предшественника. Представлены репрезентативные данные, полученные для одного донора. (Б) Представлены наложенные друг на друга кривые ингибирования, демонстрирующие антагонизм различных гуманизированных антител к CD40 в сравнении с 4D11;

на фиг. 4 - обобщение результатов оценки антагонистической (IC_{50}) и агонистической (SI = показатель стимуляции) активности гуманизированных антител, которые получали с помощью анализа пролиферации человеческих первичных В-клеток. Для сравнения представлены результаты, полученные для различных антител к CD4, а именно, 4D11, G28.5 и 5D12;

на фиг. 5 - данные оценки способности антитела В, антитела А и антитела С ингибировать индуцированную CD40 повышающую регуляцию CD86, полученные с помощью анализов цельной крови человека. Для сравнения представлены результаты, полученные для антитела к CD40 4D11. В этом анализе у применяемого в качестве контроля изотипа IgG1 эффективность не обнаружена. Представлены репрезентативные данные, полученные для одного донора;

на фиг. 6 - обобщение результатов оценки способности антитела В ингибировать индуцированную CD40 повышающую регуляцию CD86, полученные с использованием человеческих очищенных В-клеток и цельной крови человека. Данные представлены как в виде значений IC_{50} (А), так и в виде значений IC_{90} (Б). В этом анализе у применяемого в качестве контроля изотипа IgG1 не обнаружена эффективность. В таблице обобщены результаты, полученные для нескольких ($n=4-5$) доноров;

на фиг. 7 - данные оценки способности антитела В, антитела А и антитела С ингибировать индуцированную CD40 повышающую регуляцию CD86, полученные с помощью анализов цельной крови обезьяны циномогус. В этом анализе у применяемого в качестве контроля изотипа IgG1 эффективность не обнаружена. Представлены репрезентативные данные, полученные для одного донора;

на фиг. 8 - кривые зависимости концентрации в плазме от времени для антитела А (левая панель) и антитела В (правая панель) у обезьяны циномогус после введения каждого антитела в дозах 1 и 10 мг/кг. Результаты представляют собой обобщенные данные для трех животных для каждого введения каждого антитела;

на фиг. 9 - данные об изменении процента CD86-позитивных В-клеток обезьян циномолгус перед введением (антитела В) и (антитела А) и в 3 момента времени после введения каждого антитела. Антитело В (верхние панели) и антитело А вводили трем животным каждое в дозе 1 мг/кг (левые панели) или 10 мг/кг (правые панели);

на фиг. 10 - уровни (А): человеческого IgG и (Б) человеческого IgM в NSG-мышцах через 2 недели после инъекции $1,25 \times 10^6$ человеческих PBMC. Мышей обрабатывали наполнителем, применяемым для контроля изотипа антителом и антителом А, антителом В и антителом С в дозе 1 мг/кг за 1 день до переноса человеческих PBMC;

на фиг. 11 - данные о связывании различных мышиных антител к человеческому CD40 с человеческими тромбоцитами;

на фиг. 12 - обобщение результатов о сравнительном связывании антитела В с МАт к CD40 4D11 на человеческих В-клетках и тромбоцитах в цельной крови;

на фиг. 13 - ADCC-активность при применении IgG1-конструкций дикого типа и несущих "нокаут"-мутации конструкций.

Подробное описание изобретения

В настоящее время установлено, что опосредованная CD40 передача сигналов участвует в различных целевых нарушениях. Несмотря на наличие результатов ряда доклинических исследований, демонстрирующих, что вмешательство в эти нарушения может обладать терапевтической полезностью, сохраняется потребность в антагонистических антителах к CD40, которые можно применять для лечения аутоиммунных заболеваний.

Понятия "CD40" и "поверхностный антиген CD40" относятся к имеющему массу примерно 48 кДа гликопротеину, экспрессирующемуся на поверхности здоровых и неопластических В-клеток, который действует в качестве рецептора для сигналов, участвующих в пролиферации и дифференцировке клеток (Ledbetter и др., J. Immunol. 138, 1987, сс. 788-785). Молекула кДНК, кодирующая CD40, выделена из библиотеки, созданной на основе клеточной линии Raji лимфомы Беркетта (Stamenkovic и др., EMBO J. 8, 1989, с. 1403).

В контексте настоящего описания клетка, которая эндогенно экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, для которой характерна экспрессия CD40 на их поверхности, включая (но, не ограничиваясь только ими) здоровые и неопластические В-клетки, интердигитатные клетки, эпителиальные базальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные клетки, клетки миндалин и продуцируемые костным мозгом плазматические клетки.

Антитела, предлагаемые в изобретении, специфически связываются с человеческим рекомбинантным и нативным CD40. Гуманизированное моноклональное антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с человеческим CD40, обладает антагонистической активностью, характеризующейся значением IC_{50} , составляющим менее 1 нМ, и при его применении в концентрации вплоть до 100 мкг/мл не обладает агонистическим действием в отношении В-клеточной пролиферации, и указанное антитело отличается также тем, что антитело имеет время полужизни *in vivo* в организме приматов кроме человека, составляющее по меньшей мере 10 дней.

Это антитело специфически связывается с CD40 с образованием конъюгата CD40-Fc, что характеризуется значением EC_{50} , составляющим менее 1 нМ, и с CD40 на экспрессирующих CD40 клетках, что характеризуется значением EC_{50} , составляющим менее 2,5 нМ. Антагонистические свойства антител определяются тем, что они обладают антагонистической активностью в отношении В-клеток или дендритных клеток, что характеризуется значением IC_{50} , составляющим менее 1 нМ. Антитело обладает также улучшенными фармакокинетическими свойствами, обладая удлинённым временем полужизни *in vivo* по сравнению с другими антителами к CD40 (например, антителом к CD40 4D11).

В контексте настоящего описания клетка, которая экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, для которой характерна экспрессия CD40 на ее поверхности, включая (но, не ограничиваясь только ими) здоровые и неопластические В-клетки, интердигитатные клетки, эпителиальные базальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные клетки, клетки миндалин и продуцируемые костным мозгом плазматические клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула CD40 представляет собой молекулу человеческого CD40.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, распознают специфический "эпитоп антигена CD40" и "CD40-эпитоп". В контексте настоящего описания эти понятия относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, обладающей иммунореактивностью в отношении антитела к CD40 и, например, включает антигенную детерминанту CD40, распознаваемую любым антителом. Эпитопы антигена CD40 могут быть включены в белки, белковые фрагменты, пептиды или т.п. Эпитопы наиболее часто представляют собой белки, короткие олигопептиды, олигопептидные миметики (т.е. органические соединения, которые имитируют антителосвязывающие свойства антигена CD40) или их комбинации.

Общая структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью с помощью одной дисульфидной

связи с образованием гетеродимера, и гетеротетрамерная молекула образуется посредством ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкие и тяжелые цепи связаны с помощью одной дисульфидной связи, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет аминоконцевую переменную область (V_H), за которой расположены три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирный участок между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет две области, аминоконцевую переменную область (V_L) и карбоксиконцевый константный домен (C_L). V_L -область нековалентно связана с V_H -областью, а C_L -домен, как правило, ковалентно связан с C_{H1} -доменом через дисульфидную связь. Вероятно, определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными областями легких и тяжелых цепей (Chothia и др., J. Mol. Biol. 186, 1985, сс. 651-663).

Определенные участки в переменных областях значительно различаются у различных антител, т.е. они являются "гипервариабельными". Эти гипервариабельные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определяют специфичность каждого конкретного антитела в отношении специфической для него антигенной детерминанты. Гипервариабельность в переменных областях, как легкой цепи, так и тяжелой цепи, концентрируется в трех сегментах, которые обозначают как определяющие комплементарности участки (гипервариабельные участки) (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определяют путем сравнения последовательностей согласно методу, описанному у Kabat и др., в: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991, а HVL структурно определяют на основе трехмерной структуры переменной области согласно методу, описанному у Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917. Если эти два метода приводят к некоторым различиям при идентификации CDR, то предпочтительным является определение на основе структуры. Согласно номенклатуре Кэбота CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2 примерно на остатках 50-56 и CDR-L3 примерно на остатках 89-97 в переменной области легкой цепи; CDR-H1 расположен примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в переменной области тяжелой цепи. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелых и легких цепей разделены каркасными участками (FR), которые содержат последовательности, в меньшей степени имеющие тенденцию к вариабельности. Начиная с аминоконца по направлению к карбоксиконцу переменных областей тяжелых и легких цепей FR и CDR упорядочены следующим образом: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В значительной степени β -складчатая конформация FR позволяет CDR в каждой из цепей находиться в непосредственной близости друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация присуща антигенсвязывающему центру (см. Kabat и др., NIH Publ. № 91-3242, т. I, 1991, с. 647-669), хотя не является необходимым условием, чтобы все остатки CDR непосредственно участвовали в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не вовлечены непосредственно в связывание антигена, но участвуют в связанной с антигеном и/или опосредуемой антигеном эффекторной функции. Некоторые остатки FR, вероятно, оказывают выраженное воздействие на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: путем нековалентного связывания непосредственно с эпитопом, путем взаимодействия с одним или несколькими остатками CDR и путем влияния на поверхность раздела между тяжелыми и легкими цепями. Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антитело-обусловленном клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных животных относят к одному или двух четко различимых классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относят к одному из пяти основных классов с учетом последовательности константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяют на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

В контексте настоящего описания понятия "антитело", "антитело к CD40", "гуманизированное антитело к CD40" и "вариант гуманизированного антитела к CD40" применяют в наиболее широком смысле, и они относятся, в частности, к моноклональным антителам (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам) и фрагментам антител, таким как переменные области и другие участки антител, которые обладают требуемой биологической активностью, например, способностью связываться с CD40.

Понятие "моноклональное антитело" (MAт) относится к антителу из популяции практически гомогенных антител; т.е. индивидуальные антитела в указанной популяции являются идентичными, за ис-

ключением встречающихся в естественных условиях мутаций, которые могут присутствовать в очень небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, их мишенью является индивидуальная антигенная детерминанта, "эпитоп". Таким образом, прилагательное "моноклональные" является отличительным признаком практически гомогенной популяции антител, мишенью которых является идентичный эпитоп, и понятие не ограничено требованием к получению антител с помощью какого-либо конкретного метода. Должно быть очевидно, что моноклональные антитела можно получать с помощью любой техники или методологии, известной в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler и др., *Nature* 256, 1975, с. 495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, US 4816567), или методы выделения моноклональных полученных с помощью рекомбинантной ДНК антител с использованием фаговых библиотек антител, которые описаны у Clackson и др., *Nature* 352, 1991, с. 624-628 и у Marks и др., *J. Mol. Biol.* 222, 1991, сс. 581-597.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепи антител из одного вида (например, из млекопитающего кроме человека, такого как мышь) и константных областей легкой и тяжелой цепи антитела из других видов (например, человека), и их можно получать путем соединения последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных областей антитела из второго вида (например, человека), и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, что позволяет хозяину продуцировать химерное антитело. В альтернативном варианте химерное антитело может также представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулина или из консенсусной последовательности или последовательности зародышей линии. Химерные антитела могут включать фрагменты указанных антител при условии, что фрагмент антитела обладает требуемой биологической активностью родительского антитела, например способностью связываться с одним и тем же эпитопом (см., например, US 4816567; и Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, с. 6851-6855).

Понятия "фрагмент антитела", "фрагмент антитела к CD40", "фрагмент гуманизированного антитела к CD40" и "фрагмент варианта гуманизированного антитела к CD40" относятся к части полноразмерного антитела к CD40, в котором сохраняется переменная область или ее функциональная способность, например, специфичность связывания с эпитопом CD40. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fd-, Fv-, scFv- и scFv-Fc-фрагмент, димерное антитело (диабоди), линейное антитело, одноцепочечное антитело, минитело, димерное антитело, образованное из фрагментов антитела, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, с получением требуемых фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, которые называют "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим центром, при этом оставшуюся часть обозначают как "Fc"-фрагмент. Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и C_{H1}-домен тяжелой цепи. После обработки пепсином получают F(ab')₂-фрагмент, который несет два антигенсвязывающих центра и все еще сохраняет способность к перекрестному сшиванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов присутствием дополнительных остатков, включая один или несколько остатков цистеина из шарнирной области антитела на C-конце C_{H1}-домена. F(ab')₂-фрагменты антител представляют собой пары Fab'-фрагментов, связанных с помощью остатков цистеина в шарнирной области. Известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Fv"-фрагмент содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий центр, состоящий из димера, включающего переменную область одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В этой конфигурации три CDR каждой переменной области взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим центром на поверхности димера V_H-V_L. В целом, шесть CDR обуславливают специфичность антитела в отношении связывания антигена.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv"-фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv-вариант, содержащий V_H- и V_L-области антитела, при этом области присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv необязательно может содержать также полипептидный линкер, расположенный между V_H- и V_L-областями для облегчения образования трехмерной структуры, требуемой для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, в: *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1991, сс. 269-315).

Другие обладающие способностью к распознаванию фрагменты антител включают фрагменты, которые содержат пару расположенных в виде тандема Fd-сегментов (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}), образующих пару антигенсвязывающих участков. Указанные "линейные антитела" могут быть биспецифическими или моноспецифическими, что описано, например, у Zapata и др., *Protein Eng.* 8(10), 1995, с. 1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмента, который обладает способностью связываться с предварительно опре-

деленным антигеном и который содержит один или несколько FR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, практически соответствующую последовательности человеческого иммуноглобулина, и один или несколько CDR, который(ые) имеет(ют) аминокислотную последовательность, которая практически соответствует аминокислотной последовательности нечеловеческого иммуноглобулина. Указанную нечеловеческую аминокислотную последовательность, которую часто обозначают как "импортная" последовательность, как правило, получают из "импортной" области антитела, в частности, варибельной области. В целом, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, встроенные между FR варибельной области человеческой тяжелой или легкой цепи. В настоящем изобретении описаны специфические гуманизированные антитела к CD40, которые содержат CDR, полученные из мышиных моноклональных антител, которые представлены в табл. 3 и 4, встроенные между FR последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии. Должно быть очевидно, что определенные остатки мышиного FR можно импортировать для обеспечения функции гуманизированных антител, и следовательно, определенные остатки последовательностей варибельных областей тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии модифицируют для того, чтобы они были такими же, как в соответствующей мышиной последовательности.

Гуманизированное антитело к CD40 может содержать практически все из по меньшей мере одной и, как правило, двух варибельных областей (таких, например, как входящие в Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, Fabc- и Fv-фрагменты), в которых все или практически все CDR соответствуют CDR нечеловеческих иммуноглобулинов, и все CDR могут также представлять собой мышиные последовательности, подробно описанные в представленных ниже табл. 1-4, а все или практически все FR могут представлять собой FR, которые имеют консенсусную последовательность или последовательность зародышевой линии человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело к CD40 также может включать по меньшей мере часть Fc-области иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Как правило, антитело должно содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере варибельную область тяжелой цепи. Антитело может включать также при необходимости один или несколько из следующих участков: C_{H1}, шарнирная область, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело к CD40 можно выбирать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять собой комплементфиксирующий константный домен, если требуется, чтобы гуманизированное антитело обладало цитотоксической активностью, и изотип, как правило, представляет собой IgG₁. Если цитотоксическая активность не требуется, то константный домен может относиться к другому изотипу, например, IgG₂. Гуманизированное антитело к CD40 может содержать последовательности из более чем одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации требуемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. Антитела могут представлять собой антитела изотипа IgG₁ и более конкретно антитела изотипа IgG₁, в которых "выключены" эффекторные функции.

FR и CDR или HVL гуманизированного антитела к CD40 не обязательно должны соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортном CDR или HVL или в консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR можно изменять (например, посредством мутагенеза) путем замены, инсерции или делеции, в результате чего полученный аминокислотный остаток становится не идентичным исходному остатку в соответствующем положении любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию, такую как способность связываться с CD40. Указанное изменение, как правило, не должно быть обширным и должно представлять собой консервативные изменения. Как правило, по меньшей мере 75% остатков, чаще по меньшей мере 90% и наиболее часто более 95% или более 98% или более 99%, гуманизированного антитела должно соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии FR и импортных последовательностей CDR.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на поверхность раздела между варибельными областями тяжелой и легкой цепи ("поверхность раздела V_L-V_H"), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Конкретными остатками, которые могут участвовать во взаимодействиях между цепями, являются остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (согласно системе нумерации, предложенной Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В US 6407213 обсуждается также, что в указанном взаимодействии могут участвовать такие остатки как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60. Хотя указанные остатки указаны только для человеческого IgG, их можно рассматривать и для других видов. Важные остатки антитела, которые, как ожидается, могут участвовать во взаимодействиях между цепями, отбирают для замены в консенсусной последовательности.

Понятия "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом положении во всех иммуноглобулинах любого класса, изотипа или в любой субъединичной

структуре, например варибельной области человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может базироваться на иммуноглобулинах конкретных видов или множества видов. Под "консенсусной/консенсусным" последовательностью, структурой или антителом подразумевают консенсусную человеческую последовательность, указанную в конкретных вариантах осуществления изобретения, и понятие относится к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречающиеся остатки в каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах конкретного класса, изотипа или субъединичной структуры. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, которая имеет в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая может не представлять собой точную копию полной аминокислотной последовательности любого индивидуального иммуноглобулина. Варибельную область консенсусной последовательности не получают из какого-либо встречающегося в естественных условиях антитела или иммуноглобулина (Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) и его вариантов. Консенсусные последовательности FR тяжелой и легкой цепи и их варианты представляют собой ценные последовательности для получения гуманизированных антител к CD40 (см., например, US 6037454 и 6054297).

Человеческие последовательности зародышевой линии присутствуют в естественных условиях в популяции человеческих антител. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности зародышевой линии антитела легкой цепи антитела получают из консервативных человеческих ν -генов и j -генов зародышевой линии каппа или лямбда. Аналогично этому последовательности тяжелой цепи получают из ν -, d - и j -генов зародышевой линии (LeFranc M.-P. и LeFranc G., *"The Immunoglobulin Facts Book"*, изд-во Academic Press, 2001).

В контексте настоящего описания понятия "вариант", "вариант антитела к CD40", "гуманизированный вариант антитела к CD40" или "вариант гуманизированного антитела к CD40" все означают гуманизированное антитело к CD40, которое содержит, по меньшей мере, мышинный CDR варибельной области тяжелой цепи, или последовательность мышинового CDR легкой цепи, полученную из мышинового моноклонального антитела, и последовательности FR, полученные из человеческих консенсусных последовательностей. Последовательности, имеющие одну или несколько аминокислотных замен в варибельных областях одной или обеих легких цепей или тяжелых цепей, по существу, связываются с CD40. Примерами гуманизированных антител являются антитела, обозначенные как антитело А, антитело В и антитело С.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано и отделено и/или очищено от компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественного окружения антитела представляют собой субстанции, которые могут влиять на диагностическое или терапевтическое применение антитела и могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества.

Выделенное антитело представляет собой антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, в которых оно продуцировано, если в нем не присутствует ни один компонент естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, во время которой удаляют рекомбинантный клеточный материал.

Понятие "характеристика антитела" относится к факторам, которые описывают распознавание антителом антигена или эффективность антитела *in vivo*. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и время полужизни антитела.

В контексте настоящего описания понятие "эпитопное мечение" относится к антителу к CD40, слитому с "эпитопной меткой". "Эпитопная метка" представляет собой полипептид, состоящий из достаточного количества аминокислот для создания эпитопа для производства антитела, при этом ее создают так, чтобы она не оказывала воздействия на требуемую активность гуманизированного антитела к CD40. Эпитопная метка, как правило, является в значительной степени уникальной, в результате чего антитело, которое образуется против эпитопной метки, не дает выраженную перекрестную реакцию с другими эпитопами. Приемлемые полипептиды-метки, как правило, содержат по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и, как правило, содержат примерно 8-50 аминокислотных остатков или примерно 9-30 остатков. Примерами эпитопных меток и антител, которые связываются с эпитопом, являются полипептид-метка flu HA (HA вируса гриппа) и соответствующее ему антитело 12CA5 (Field и др., *Mol. Cell. Biol.* 8, 1988 2159-2165); с-пус-метка и соответствующие антитела 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 (Evan и др., *Mol. Cell.*

Biol. 5(12), 1985, с. 3610-3616); и метка, включающая гликопротеин D (gD) вируса герпеса простого, и соответствующее антитело (Paborsky и др. *Protein Engineering* 3(6), 1990, с. 547-553). Эпитопная метка может представлять собой "связывающий антитело эпитоп-"спасатель". В контексте настоящего описания понятие "связывающий антитело эпитоп-"спасатель" относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG

(такой как IgGV₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), ответственному за удлинение времени полужизни молекулы IgG *in vivo* в сыворотке.

Описанные в заявке антитела можно конъюгировать с цитотоксическим агентом. Он может представлять собой субстанцию, которая ингибирует или препятствует функции клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Под понятие попадают радиоактивные изотопы (такие как I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, и Re¹⁸⁶), химиотерапевтические средства и токсины, такие как обладающие ферментативной активностью токсины, полученные из бактерий, грибов, растений или животных, и их фрагменты. Указанные цитотоксические агенты можно сшивать с гуманизированными антителами с помощью стандартных процедур и применять, например, для лечения пациента, которому показана терапия на основе антитела.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, которое можно применять для лечения рака. Известны многочисленные примеры химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с терапевтическими антителами. Примерами указанных химиотерапевтических средств являются алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (прежде всего буллатацин и буллатацинон); камптотecin (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и бизелесин); криптофицины (прежде всего криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин, ауристатины (включая такие аналоги, как монометил-ауристатин E и монометил-ауристатин F); дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; аналоги азотистого иприта, такие как хлорамбуцил, хломафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлорметамин, мелфалан, новембихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин (азотистоипритовое производное урацила); нитрозмочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энединные антибиотики (например, калихеаминцин, прежде всего калихеаминцин гамма II и калихеаминцин phiII (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33, с. 183-186); динемидин, включая динемидин A; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарзиностатиновый хромофор и родственный хромопротеин хромофоров энединных антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофелин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диаза-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (AdriamycinTM) (включая морфолино-доксорубицин, цианморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромидин, хеломицин, родарубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамитрин, тиогуанин, пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксидуредин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксурин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолонпропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадренергетики, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; энидурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатрексат; дефофамин; декеолцин; диазихон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамед; пирарубицин; лосоксантрон; подафиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазихон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (прежде всего токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустрин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL®, фирма Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, штат Нью-Джерси) и доцетаксел (TAXOTERE®, фирма Rhone-Poulenc Rorer, Энтони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин (GemzarTM); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NavelbineTM); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминокптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS-2000; дифторметилорнитин (ДМПО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин, и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше соединений. Также под объем этого определения подпадают антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормона на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например тамоксифен (включая NolvadexTM), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FarestonTM); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулируют производство эстрогена надпочечниками, такие, например, как 4(5)-имидазолы,

аминоглутетимид, мегестрола ацетат (Megace™), эксместан, форместан, фадрозол, ворозол (Rivisor™), летрозол (Femara™) и анастрозол (Arimidex™); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гoserелин, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше соединений. Любое одно или несколько этих средств можно конъюгировать с гуманизированными антителами, предлагаемыми в настоящем изобретении, с получением ценного терапевтического средства, которое можно применять для лечения различных нарушений.

Антитела можно конъюгировать также с пролекарствами. "Пролекарство" представляет собой предшественник или производное фармацевтически активной субстанции, которые менее цитотоксичны для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и обладают способностью активироваться или превращаться в более активную исходную форму с помощью ферментов (см., например, Wilman в: "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemicals Society Transactions, 14, 1986, с. 375-382, 615-й симпозиум в Белфасте (1986); и Stella и др. в: "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, под ред. Borchardt и др., изд-во Humana Press, 1985, с. 247-267). Пригодные пролекарства включают (но, не ограничиваясь ими) фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, модифицированные D-аминокислотой пролекарства, гликозилированные пролекарства, β-лактамосодержащие пролекарства, пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид, или пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид, 5-фторцитозин- и другие 5-фторуридинсодержащие пролекарства, которые могут превращаться в более активную цитотоксическую свободную лекарственную форму. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут образовывать производные в виде пролекарства, включают (но, не ограничиваясь ими) описанные выше химиотерапевтические средства. Для диагностических целей, а также для мониторинга лечения антитела можно конъюгировать также с меткой, либо только с меткой, либо с меткой в сочетании с дополнительным вторым агентом (пролекарство, химиотерапевтическое средство и т.п.). Метка в отличие от второго дополнительно агента представляет собой субстанцию, которая представляет собой выявляемое соединение или выявляемую композицию, и ее можно конъюгировать прямо или косвенно с гуманизированным антителом. Метка сама по себе может представлять собой выявляемую субстанцию (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, как в случае ферментативной метки, она может катализировать химическое изменение соединения или композиции, представляющего/представляющей собой субстрат, которое можно выявлять.

Меченое гуманизированное антитело к CD40 можно приготавливать и применять для различных целей, включая диагностику *in vitro* и *in vivo*.

Антитела можно приготавливать таким образом, чтобы они представляли собой часть препарата в виде липосомы, для их эффективного введения *in vivo*. "Липосома" представляет собой небольшой пузырек, состоящий из различного типа липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активное вещество, который можно применять для введения млекопитающему соединения или композиции, например гуманизированного антитела к CD40, в сочетании или в комбинации с одним или несколькими фармацевтическими действующими веществами и/или метками. Компоненты липосом обычно упорядочены в виде двуслойной структуры, аналогичной липидной структуре биологических мембран.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей во встречающихся в естественных условиях клетках.

Можно осуществлять рекомбинантную экспрессию одного или нескольких доменов гуманизированных антител. Для осуществления указанной рекомбинантной экспрессии можно применять одну или несколько контролирующих последовательностей, т.е. полинуклеотидных последовательностей, необходимых для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Пригодные для прокариотических клеток контролирующие последовательности включают, например, последовательности промотора, оператора и сайта связывания рибосомы. В эукариотических клетках контролирующие последовательности включают (но, не ограничиваясь только ими) промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Указанные контролирующие последовательности можно применять для экспрессии и производства гуманизированного антитела к CD40 в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, нуклеиновая кислота предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде предпротеина, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что может облегчать трансляцию. Как правило, "функционально связан" обозначает, что связанные последовательности ДНК являются смежными,

а в случае секреторного лидера, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Связывание осуществляют путем встраивания лигированием в соответствующий сайт рестрикции. Если такие сайты не существуют, то можно применять синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

В контексте настоящего описания понятия "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используются взаимозаменяемо, и все такие понятия включают потомство. Так, понятия "трансформация" и "трансформированные клетки" включают первичную представляющую интерес клетку и полученные из нее культуры, вне зависимости от количества пересевов.

Понятие "млекопитающее", подлежащее лечению, относится к любому животному, которое принадлежит к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также живущих в зоопарке животных, предназначенных для спорта или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

В контексте настоящего описания понятие "нарушение" означает любое состояние, которое можно облегчать посредством лечения гуманизированным антителом к CD40, представленным в настоящем описании. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, том числе патологические состояния, которые приводят к предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому нарушению. Примерами нарушений, которые можно лечить являются (но, не ограничиваясь только ими) рак, злокачественные гематологические заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли; лейкозы и лимфоидные злокачественные заболевания; а также воспалительные, ангиогенные, аутоиммунные и иммунологические нарушения.

Понятия "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, отличается нерегулируемым ростом клеток. Примерами рака являются (но, не ограничиваясь только ими) карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкоз.

В контексте настоящего описания понятие "ассоциированное с CD40 нарушение" или "ассоциированное с CD40 заболевание" относится к состоянию, при котором показана модификация или элиминация клеток, экспрессирующих CD40. Они включают экспрессирующие CD40 клетки, для которых характерна аномальная пролиферация, или экспрессирующие CD40 клетки, которые ассоциированы с раковым или злокачественным ростом. Более конкретными примерами видов рака, для которых характерна аномальная экспрессия антигена CD40, являются В-лимфобластоидные клетки, лимфома Беркетта, множественная миелома, Т-клеточные лимфомы, саркома Капоши, остеосаркома, эпидермальные и эндотелиальные опухоли, рак поджелудочной железы, легкого, молочной железы, яичника, ободочной кишки, предстательной железы, головы и шеи, кожи (меланома), мочевого пузыря и почки. Указанные нарушения включают (но, не ограничиваясь только ими) лейкозы, лимфомы, включая В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; плотные (солидные) опухоли, включая саркомы, такие как остеосаркома, саркома Юинга, злокачественная меланома, аденокарцинома, включая аденокарциному яичника, саркому Капоши/опухоль Капоши и плоскоклеточную карциному.

Ассоциированное с CD40 нарушение включает также заболевания и нарушения иммунной системы, такие как аутоиммунные нарушения и воспалительные нарушения. Такие состояния включают (но, не ограничиваясь только ими), ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), склеродерму, синдром Шегрена, рассеянный склероз, псориаз, воспалительное заболевание кишечника (например, неспецифический язвенный колит и болезнь Крона), воспаление легких, астму и идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP).

В контексте настоящего описания фраза "прекращение роста" или "ингибирование роста" относится к ингибированию роста или пролиферации клетки, прежде всего клетки неопластического типа, экспрессирующей антиген CD40. Таким образом, ингибирование роста, например, приводит к значительному уменьшению процента неопластических клеток, находящихся на S-фазе.

Понятие "внутривенная инфузия" относится к интродукции агента в вену больного животного или человека в течение периода времени, превышающего примерно 15 мин, как правило, в течение примерно 30-90 мин.

Понятие "внутривенный болюс" или "внутривенный импульс" относится к введению лекарственного средства животного или человека таким образом, чтобы лекарственное средство поступало в организм в течение примерно 15 мин или менее, как правило, 5 мин или менее.

Понятие "подкожное введение" относится к интродукции агента под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара. Пощипывание или оттягивание кожи вверх вниз от низлежащей ткани может создавать карман.

Понятие "подкожная инфузия" относится к интродукции лекарственного средства под кожу больного животного или человека, предпочтительно в карман между кожей и низлежащей тканью, путем относительно медленного пролонгированного введения из содержащего лекарственное средство резервуара в течение периода времени, составляющего (но, не ограничиваясь только указанным) 30 мин или менее или 90 мин или менее. Необязательно инфузию можно осуществлять путем подкожной имплантации на-

соса для введения лекарственного средства, имплантированного под кожу больного животного или человека, при этом насос обеспечивает введение лекарственного средства в предварительно определенном количестве в течение предварительно определенного периода времени, составляющего 30, 90 мин или периода времени, соответствующего продолжительности схемы лечения.

Понятие "подкожный болюс" относится к введению лекарственного средства под кожу больного животного или человека, при этом продолжительность введения лекарственного средства в виде болюса составляет менее примерно 15 мин; в другом объекте изобретения менее 5 мин, а еще в одном объекте изобретения в течение менее 60 с. Введение осуществляют в карман между кожей и низлежащей тканью, где карман можно создавать путем пощипывания или оттягивания кожи вверх вниз от низлежащей ткани.

В контексте настоящего описания понятие "терапевтически эффективное количество" относится к количеству действующего вещества, при использовании которого происходит ослабление или облегчение одного или нескольких симптомов нарушения, подлежащего лечению. Действующее вещество применяют таким образом, что в указанном количестве оно оказывает благоприятное действие на пациента, например, действие, проявляющееся в прекращении роста или приводящее к элиминации клеток. При этом действующее вещество, взятое в терапевтически эффективном количестве, обладает апоптозной активностью или способностью индуцировать клеточную гибель. Терапевтически эффективное количество также относится к концентрации в сыворотке пациента, при которой, как установлено, действующее вещество является эффективным в отношении замедления развития болезни. Эффективность можно оценивать общепринятыми путями в зависимости от подлежащего лечению состояния. Например, при неопластических заболеваниях или нарушениях, отличающихся присутствием клеток, которые экспрессируют CD40, эффективность можно оценивать по времени до прогрессирования заболевания или по уровням ответов.

В контексте настоящего описания понятия "лечение" и "терапия" и т.п. относятся к терапевтическим, а также профилактическим или подавляющим мероприятиям в отношении заболевания или нарушения, которые приводят к любому клинически важному или благоприятному действию, включая (но, не ограничиваясь только ими) облегчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение развития заболевания или нарушения. Таким образом, например, под понятие "лечение" подпадает введение агента до или после начала проявления симптома заболевания или нарушения, что приводит к предупреждению или устранению одного или нескольких признаков заболевания или нарушения. В другом примере понятие относится к введению агента после клинического проявления болезни для борьбы с симптомами болезни. Кроме того, в контексте настоящего описания понятия "лечение" или "терапия" относятся к введению агента после возникновения и после развития клинических симптомов, где введение оказывает воздействие на клинические параметры заболевания или нарушения, такие как степень повреждения ткани или количество и распространение метастазов, вне зависимости от того приводит или нет лечение к облегчению заболевания. Кроме того, если применение композиций либо индивидуально, либо в сочетании с другим терапевтическим средством купирует или облегчает по меньшей мере один из симптомов подлежащего лечению нарушения по сравнению с указанным симптомом без применения содержащей гуманизованное антитело к CD40 композиции, результат следует рассматривать как эффективное лечение требуемого нарушения вне зависимости от того, происходит или нет облегчение всех симптомов нарушения.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковке" относится к инструкциям, которые принято включать в предназначенные для продажи упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, методах применения, введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

Антитела.

В настоящем изобретении описаны и предложены гуманизированные антитела к CD40 и композиции, содержащие одно или несколько гуманизированных антител к CD40, предлагаемых в настоящем изобретении. Описаны также связывающие агенты, которые включают антигенсвязывающий фрагмент гуманизованного антитела к CD40. Гуманизированные антитела к CD40 и связывающие агенты могут прекращать рост клеток, что приводит к элиминации клеток, экспрессирующих CD40, или иным образом индуцировать или вызывать цитотоксическое или цитостатическое действие в отношении клеток-мишеней. Гуманизированные антитела к CD40 и связывающие агенты можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений, отличающихся пролиферацией клеток, которые экспрессируют поверхностный антиген CD40. Гуманизованное антитело к CD40 и CD40-связывающий агент каждое/каждый включает область, которая специфически распознает эпитоп CD40 (т.е. антигенсвязывающий фрагмент).

При первичной оценке отобранные мышинные антитела на основе их характеристик связывания с CD40.

На этапе начальных исследований отбирали мышинные антитела, которые имели переменные области тяжелых цепей, которые представлены ниже в табл. 1, переменные области легких цепей, которые представлены в табл. 2.

Таблица 1. Мышиные "лидерные" антитела к CD40-последовательности VH

	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHVWKQRPEKGLEWIGR
	IDPEDGDSKYAPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDТАVYYCTTSY
2H11	YVGTYYGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 1)
	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHVWKQRPEKGLEWIGR
	IDPEDGDTKYDPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDТАVYYCTTSY
10F2	YVGTYYGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 2)
	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYVHVWKQRPEKGLEWIGR
	IDPEDGDTKFAPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDТАVYYCTTSY
19B10	YVGTYYGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 3)
	EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAY
	ISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNANKNTLFLQMTSLRSEDТАLYYCARQD
20E2	GYRYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Таблица 2. Мышиные "лидерные" антитела к CD40-последовательности VK

	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLWIYST
	SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQRTFYPYTFGGG
2H11	TKLEIK (SEQ ID NO: 5)
	QIVLTQSPTIMASAPGEKVIITCSATSSVSILWFQKPGTSPKLWIYST
	SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQRTFYPYTFGGG
10F2	TKLEIK (SEQ ID NO: 6)
	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLWIYST
	SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQRTFYPYTFGGG
19B10	TKLEIK (SEQ ID NO: 7)
	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWHQKPGQPP
	KLLIYWTSTRESGVPRFTGSGSGTDFLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTY
20E2	PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)

Последовательности человеческих каркасных участков отбирали для каждого мышиного "лидерного" антитела на основе гомологии каркасных участков, структуры CDR, консервативных канонических остатков, консервативных остатков, образующих поверхность раздела, и других параметров.

Отобранные CDR мышиных тяжелых цепи и легких цепей различных мышиных антител представлены в табл. 3 и 4 соответственно:

Таблица 3. Последовательности CDR тяжелых цепей

Обозначение конструкции	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	<u>GFNIKDYVHV</u>	<u>RIDPEDGDSKYAPKFQG</u>	<u>SYVVGTYGY</u>
	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 16
10F2	<u>GFNIKDYVHV</u>	<u>RIDPEDGDTKYDPKFQG</u>	<u>SYVVGTYGY</u>
	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 16
19B10	<u>GFNIKDYVHV</u>	<u>RIDPEDGDTKFAPKFQG</u>	<u>SYVVGTYGY</u>
	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16
20E2	<u>GFTFSDYGMH</u>	<u>YISSGNRIYYADTVKG</u>	<u>QDGYRYAMDY</u>
	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17

Представленные выше последовательности H-CDR1 определены согласно номенклатуре Хотиа (Al-Lazikani и др., JMB 273, 1997, с. 927-948). Последовательности CDR1 и CDR2, определенные согласно номенклатуре Кэбота выделены жирным шрифтом и курсивом, а остатки, определенные согласно номенклатуре IMGT, подчеркнуты в указанной выше таблице. Последовательности H-CDR3 для каждого из антител 2H11, 10F2 и 19B10 представляют собой TTSYVVGTYGY (SEQ ID NO: 77), а для 20E2 представляет собой ARQDGYRYAMDY (SEQ ID NO: 78).

Таблица 4. Последовательности CDR легких цепей

Обозначение конструкции	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2H11	<u>SASSSVSYML</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>OORTFYPT</u>
	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24
10F2	<u>SATSSVSIL</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>OORTFYPT</u>
	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24

19B10	<u>SASSSVSYML</u>	<u>STSNLAS</u>	<u>QORTFYPTY</u>
	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24
20E2	<u>KSSQSLNSGNOKNYLT</u>	<u>WTSTRES</u>	<u>ONDYTYPLT</u>
	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25

И в этом случае также в табл. 4 применяли номенклатуру Хотиа, при этом последовательности, определенные согласно номенклатуре Кэбота, выделены жирным шрифтом и курсивом, а определенные согласно номенклатуре IMGT, подчеркнуты.

Fab-фрагменты, для которых обнаружено улучшенное или эквивалентное связывание по сравнению с химерным родительским Fab-фрагментом, отбирали для конверсии в IgG. Клоны из 20E2-серий превращали в два различных формата IgG: а) IgG4DM (двойной мутант (double mutant)) имел две мутации в Fc/шарнирной области, а именно, мутацию Ser228Pro, которая приводит к снижению образования половинок молекул, и мутацию Leu235Glu, которая дополнительно снижает связывание FcγR. б) IgG1KO ("выключение" (knock-out) эффекторных функций) имел две мутации в Fc-области, а именно, Leu234Ala и Leu235Ala, которые снижают эффекторную функцию, такую как связывание FcγR и комплемента. Оба формата IgG описаны в литературе. В примере 1 более подробно описана гуманизация трех антител-"кандидатов". В результате осуществления указанной гуманизации удалось создать последовательности гуманизированных антител, последовательности легких и тяжелых цепей которых представлены ниже

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
Антитело А (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNSGNQKNYLTW</u> <u>HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKEIKR</u> TVAAPSVFI FPFSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27

Антитело А (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Антитело А (тяжелая цепь, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFEFGGPSVFLFP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	29
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Антитело В (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEKVTINCKSSQSLINSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYWTSSTRESGVDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKEIKRTVA</u> APSVFI F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPI E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33

Антитело В (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQ</u> <u>GLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQ</u> <u>GLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPI E KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Антитело С (легкая цепь)	<u>DIQMTQSPSSLSASV</u> <u>GDRTITCSASSSVSYMLWFO</u> <u>QKPKGAPKLLIYSTN</u> <u>LASGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQQR</u> <u>TFYPYTFGGGT</u> <u>TKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> <u>VCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPK</u> <u>FQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGLTVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPI E KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> <u>VCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPK</u> <u>FQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGLTVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPI E KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Антитело С (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> <u>VCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPK</u> <u>FQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGLTVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	39
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVK</u> <u>VCTASGFNIKDYVHWVKQAP</u> <u>GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPK</u> <u>FQ GKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGT</u> <u>YGYWGQGLTVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPI E KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

Антигенсвязывающий фрагмент может, например, блокировать пролиферацию или иным образом прекращать рост клеток или вызывать их истощение, гибель, элиминировать их иным путем, например, посредством связывания с поверхностным антигеном CD40. Например, при Т- и В-клеточных злокачественных заболеваниях частым результатом являются противоопухолевые воздействия (например, прекращение роста с элиминацией или апоптозом клеток или без них), когда злокачественные клетки подвергают действию стимулов, которые приводят к активации здоровых лимфоцитов. Это прекращение

индуцированного активацией роста обнаружено в присутствии сигналов, проходящих либо через рецепторы антигенов, либо через костимулирующие рецепторы (см., например, Ashwell и др., *Science* 237, 1987, с. 61; Bridges и др., *J. Immunol.* 139, 1987, с. 4242; Page и Defranco, *J. Immunol.* 140, 1988, с. 3717; и Beckwith и др., *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1990, с. 501). Стимуляция CD40 в результате специфического связывания либо с антителом, либо с растворимым лигандом ингибирует рост В-клеточной лимфомы (см., например, Funakoshi и др., *Blood* 83, 1994, с. 2787-2794). Агенты, которые таким образом ингибируют рост злокачественных клеток и непосредственной мишенью которых является поверхностный антиген CD40, являются примерами пригодных агентов.

CD40-специфические агенты включают антигенсвязывающий фрагмент гуманизированного антитела к CD40, которое связывается с CD40 (например, человеческим CD40 или его вариантом). CD40-специфические агенты и антитела необязательно можно конъюгировать или сливать с цитотоксическим или химиотерапевтическим средством. Когда гуманизированное антитело связывается с поверхностным антигеном CD40 и вызывает истощение экспрессирующих CD40 типов клеток, связывание, как правило, отличается хомингом к несущей поверхностной антиген CD40 клетке *in vivo*. Приемлемые связывающие агенты, которые связываются с антигеном CD40 с достаточной аффинностью и/или авидностью, например, CD40-специфический агент, можно применять в качестве терапевтического средства путем специфического направленного переноса к клетке, экспрессирующей антиген.

Гуманизированное антитело может уменьшать связывание лиганда CD40 с CD40 по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%.

Гуманизированные антитела к CD40 необязательно включают специфические аминокислотные замены в консенсусных каркасных участках или каркасных участках зародышевой линии.

Специфическая замена аминокислотных остатков в этих каркасных участках может улучшать различные аспекты действия антител, такие как аффинность связывания и/или стабильность, по сравнению с установленными у гуманизированных антител, полученных путем "непосредственного обмена" CDR или HVL на каркасные участки человеческой зародышевой линии, что продемонстрировано ниже в примерах.

Пригодные антитела могут быть химерными антителами с заменами CDR-участков (т.е. например, замена одного или двух CDR в антителе А на аналогичные CDR из антитела С) между этими приведенными в качестве примеров иммуноглобулинами.

Гуманизированное антитело к CD40 может быть его фрагментом. Различные фрагменты антител в целом описаны выше, а также описаны методы, разработанные для получения фрагментов антител. Фрагменты можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и др., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24, 1992, с. 107-117 и Brennan и др., *Science* 229, 1985, с. 81). В альтернативном варианте фрагменты можно получать непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (см., например, Carter и др., *Bio/Technology* 10, 1992, с. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантной клетки-хозяина. Другие методики получения фрагментов антител должны быть очевидны специалисту в данной области.

Антитело или фрагмент антитела может включать константную область, которая опосредует эффекторную функцию. Константная область может опосредовать ответы, представляющие собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) в отношении экспрессирующей CD40 клетки-мишени. Эффекторный(ые) домен(ы) может(могут) представлять собой, например, Fc-область молекулы Ig. Как правило, CD40-связывающий агент рекрутирует и/или активирует цитотоксичные лейкоциты крови (например, естественные клетки-киллеры (NK), фагоцитарные клетки (например, макрофаги) и/или сывороточные компоненты системы комплемента).

Эффекторный домен антитела можно получать из организма любых приемлемых видов позвоночных животных и любых изотипов. Изотипы из организма различных видов животных отличаются по способности опосредовать эффекторные функции. Например, способность человеческого иммуноглобулина опосредовать CDC и ADCC/ADCP, как правило, соответствует следующему порядку $IgM \approx IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 > IgG_4$ и $IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 / IgM / IgG_4$ соответственно. Способность мышиных иммуноглобулинов опосредовать CDC и ADCC/ADCP, как правило, соответствует следующему порядку: мышиный $IgM \approx IgG_3 > IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1$ и $IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1 > IgG_3$ соответственно. В другом примере мышиный IgG_{2a} опосредует ADCC, а мышиный IgG_{2a} и IgM опосредуют CDC.

Модификации антител.

Гуманизированные антитела к CD40 и агенты могут включать модификации гуманизированного антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, может потребоваться модифицировать антитело в отношении его эффекторной функции, повышая тем самым эффективность антитела при лечении рака. Одной такой модификацией является интродукция остатка(ов) цистеина в Fc-область, что приводит к образованию в этой области дисульфидной связи между цепями. Полученное таким образом

гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или повышенной комплементзависимой цитотоксичностью и антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC) (см. Caron и др., *J. Exp. Med.*, 176, 1992, с. 1191-1195 и Shopes, *J. Immunol.*, 148, 1992, с. 2918-2922). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью можно получать также с использованием гетеробифункциональных перекрестносшивающих линкеров, согласно методике, описанной у Wolff и др., *Cancer Research*, 53, 1993, с. 2560-2565. Можно сконструировать антитело, имеющее удвоенное количество Fc-областей, благодаря чему оно может иметь повышенную способность к зависящему от комплемента лизису и ADCC (см. Stevenson и др., *Ant-Cancer Drug Design*, 3, 1989, с. 219-230).

Антитела с повышенной способностью поддерживать ADCC получали путем модификации схемы гликозилирования их Fc-области. Это представляется возможным, поскольку гликозилирование антитела на остатке аспарагина, N297, в C_{H2}-домене участвует во взаимодействии между IgG и Fcγ-рецепторами, которое необходимо для ADCC. Конструировали линии клеток-хозяев для экспрессии антител с измененным гликозилированием, например, с повышенным уровнем участвующего в образовании бисекционной структуры N-ацетилглюкозамина или пониженным уровнем фукозы. Повышенный уровень фукозы обеспечивает более значительное повышение ADCC-активности, чем увеличение уровня участвующего в образовании бисекционной структуры N-ацетилглюкозамина. Кроме того, повышенная ADCC-активность антител с низким уровнем фукозы не зависит от V/F-полиморфизма FcγRIIIa.

Модификация аминокислотной последовательности Fc-области антител является альтернативой гликозилирования в отношении повышения ADCC-активности. Сайт связывания на человеческом IgG₁ Fcγ-рецепторов был определен с помощью расширенного анализа мутаций. Это позволило создавать гуманизированные антитела изотипа IgG₁ с мутациями в Fc-области, которые повышали аффинность связывания с FcγRIIIa и усиливали ADCC-активность *in vitro*. Кроме того, получали варианты Fc с многочисленными различными пермутациями способности к связыванию, например, с повышенной способностью к связыванию со специфическими FcγR-рецепторами, но с неизменной или пониженной способностью к связыванию с другими FcγR-рецепторами.

Иммуноконъюгаты содержат гуманизированное антитело или его фрагмент, конъюгированное/конъюгированный с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтическое средство, токсин (например, обладающий ферментативной активностью токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Химиотерапевтические средства, которые можно применять для получения таких иммуноконъюгатов, описаны выше. Обладающие ферментативной активностью токсины и их фрагменты, которые можно применять, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, трикотецены и т.п. Для получения радиоконъюгатов гуманизированных антител к CD40 можно применять различные радионуклиды. Их примерами являются ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re.

Конъюгаты гуманизированного антитела к CD40 и цитотоксического или химиотерапевтического средства можно получать известными методами, с использованием целого ряда бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдтиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бисазидосоединения (такие как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис(пара-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получать согласно методу, описанному у Vitetta и др., *Science*, 238, 1987, с. 1098). Меченная с помощью ¹⁴C 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом.

Конъюгаты можно получать также с использованием расщепляемого линкера.

Антитело можно конъюгировать с "рецептором" (таким как стрептавидин) для использования в предварительном направленном переносе в опухоль. При осуществлении этой процедуры конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту с последующим удалением несвязанного конъюгата из кровотока с помощью агента для клиренса и затем вводят "лиганд" (например, авидин), конъюгированный с цитотоксическим агентом (например, радионуклеотидом).

На основе гуманизированных антител к CD40 можно приготавливать формы типа иммунолипосом. Содержащие антитело липосомы получают с помощью хорошо известных в данной области методов, например, описанных у Epstein и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 82, 1995, с. 3688; Hwang и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 77, 1980, с. 4030; US 4485045 и 4544545. Липосомы с удлиненным временем жизни в кровотоке описаны в US 5013556.

Наиболее предпочтительные липосомы можно получать методом упаривания с обращенной фазой с

использованием липидной композиции, включающей фосфатидилхолин, холестерин и дериватизированный с помощью ПЭГ фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, получая липосомы требуемого диаметра. Fab'-фрагменты антитела можно включать в липосомы согласно методу, описанному у Martin и др., *J. Biol. Chem.*, 257, 1982, с. 286-288, посредством реакции образования дисульфидной связи. В липосомы необязательно можно включать химиотерапевтический агент (такой как доксорубин) (см. Gabizon и др., *J. National Cancer Inst.*, 81(19), 1989, с. 1484).

Антитела можно применять в ADEPT (процедуры на основе антитело-направленного фермента пролекарственной терапии) путем конъюгации антитела с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидный химиотерапевтический агент) в активное противораковое лекарственное средство (см., например, WO 81/01145, WO 88/07378 и US 4975278). Компонент иммуноконъюгата, представляющий собой фермент, который можно применять в ADEPT, может включать любой фермент, который обладает способностью оказывать такое воздействие на пролекарство, в результате которого оно превращается в более активную цитотоксическую форму. Конкретные ферменты, которые можно применять в ADEPT, включают (но, не ограничиваясь только ими) щелочную фосфатазу, которая может превращать содержащий фосфат пролекарства в свободные лекарственные субстанции; арилсульфатазу, которая может превращать содержащий сульфат пролекарства в свободные лекарственные субстанции; цитозиндеаминазу, которая может превращать нетоксичный 5-фторцитозин в противораковую лекарственную субстанцию 5-фторурацил; протеазы, такие как протеиназа Serratia, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины B и L), которые можно применять для превращения содержащих пептид пролекарств в свободные лекарственные субстанции; D-аланилкарбоксипептидазы, которые могут превращать пролекарства, содержащие D-аминокислотные заместители; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, которые можно применять для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные субстанции; β -лактамазу, которую можно применять для превращения пролекарств, дериватизированных β -лактамами, в свободные лекарственные субстанции; и амидазы пенициллина, такие как амидаза пенициллина V или амидаза пенициллина G, которые можно применять для превращения лекарственных субстанций, дериватизированных по азотам амина феноксиацетильной или фенилацетильной группами, соответственно, в свободные лекарственные субстанции. Можно также применять антитела с ферментативной активностью ("абзимы") для превращения пролекарств в свободные активные лекарственные субстанции (см., например, Massey, *Nature* 328, 1987, с. 457-458). Конъюгаты антитело-абзим можно получать с помощью известных в данной области методов, предназначенных для введения абзима в популяцию опухолевых клеток, например, путем ковалентного связывания фермента с гуманизированным антителом к CD40/гетеробифункциональными перекрестносшивающими реагентами, которые описаны выше. Слитые белки, которые содержат по меньшей мере антигенсвязывающий центр антитела, сцепленный, по меньшей мере, с функционально активной областью фермента можно конструировать с использованием метода рекомбинантной ДНК (см., например, Neuberger и др., *Nature* 312, 1984, с. 604-608).

Иногда требуется применение фрагмента гуманизованного антитела к CD40 вместо интактного антитела, например, для повышения способности проникать в опухоль. Может потребоваться модифицировать фрагмент антитела для удлинения времени полужизни в сыворотке. Для этой цели можно, например, включать связывающийся с рецептором эпитоп-"спасатель" во фрагмент антитела.

Согласно одному из методов соответствующую область антитела можно изменять (например, подвергать мутации) или эпитоп можно встраивать в пептидную метку, которую затем сливают с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, с использованием ДНК или пептидного синтеза (см., например, WO 96/32478).

Кроме того, можно применять ковалентные модификации гуманизованного антитела к CD40. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, карбоксильных боковых групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков, или серильных, или треонильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное сшивание гликозидов с антителом. Указанные модификации можно осуществлять с помощью химического синтеза или путем ферментативного или химического расщепления антитела, если это возможно. Для интродукции других типов ковалентных модификаций в молекулу антитела можно применять взаимодействие меченых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который может взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или аминоконцевыми или карбоксиконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе, можно осуществлять химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1987, с. 52 и у Edge и др., *Anal. Biochem.*, 118, 1981, с. 131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на антителах можно осуществлять с помощью эндо- и экзогликозидаз согласно методу, описанному у Thotakura и др., *Meth. Enzymol.*, 138, 1987, с. 350.

Другой тип пригодной ковалентной модификации предусматривает связывание антитела с одним из многочисленных небелковых полимеров, таких, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксисилкены, с помощью методов, описанных в одном или нескольких US 4640835, US 4496689, US 4301144, US 4670417, US 4791192 и US 4179337.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности.

Варианты аминокислотной последовательности антитела к CD40 можно получать путем интродукции соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела к CD40 или с помощью пептидного синтеза. Указанные варианты включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител к CD40, представленных в качестве примера в настоящем описании. Для получения конечной конструкции применяют любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут также изменять пост-трансляционный процессинг гуманизированного антитела к CD40 или его варианта, например изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Пригодным методом идентификации конкретных остатков или областей в антителе к CD40, которые представляют собой предпочтительные сайты для мутагенеза, является так называемый "аланин-сканирующий мутагенез", описан у Cunningham и Wells, Science, 244, 1989, с. 1081-1085). С его помощью идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (как правило, на аланин) для воздействия на взаимодействие аминокислот с антигеном CD40. Те положения аминокислот, для которых продемонстрирована функциональная чувствительность к заменам, затем усовершенствуют путем интродукции дополнительных или других вариантов в сайты замены или сайты замены. При этом, хотя сайт для интродукции вариации аминокислотной последовательности является predetermined, природа самой мутации не является predetermined. Например, для анализа эффективности мутации в рассматриваемом сайте осуществляют сканирование аланином или неспецифический мутагенез кодона-мишени или области-мишени и полученные в результате экспрессии варианты антитела к CD40 подвергают скринингу в отношении требуемой активности.

Инсерции в аминокислотную последовательность включают аминокислоты и/или карбоксиконцевые слияния различной длины от одного остатка до полипептидов, которые содержат сто или большее количество остатков, а также инсерции внутрь последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примерами концевых инсерций является антитело к CD40, слиток с эпитопом-меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела к CD40 включают слияние с N- или C-концом антитела к CD40 фермента или полипептида, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

Другим типом варианта является вариант, включающий аминокислотную замену. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела к CD40 удален, а другой остаток встроен на его место. Представляющими наибольший интерес сайтами для мутагенеза путем замен являются гипервариабельные участки, но можно осуществлять также изменения в FR. Консервативные замены представлены в табл. 5 под названием "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно интродуцировать более существенные замены, обозначенные как "Примеры замен", или другие замены, описанные ниже при ссылке на класс аминокислот, и затем продукты можно подвергать скринингу.

Таблица 5

Исходный остаток	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu;	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Phe; Ile	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

В химии белков является общепринятым, что биологические свойства антитела можно модифицировать путем выбора замен, которые в значительной степени различаются по их воздействию на поддержание (а) структуры каркаса полипептида в области замены, например складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (в) размера боковой цепи. Встречающиеся в естественных условиях остатки подразделяют на группы на основе общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены предусматривают замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Любой из остатков цистеина, не участвующий в поддержании соответствующей конформации гуманизированного антитела к CD40 или его варианта, можно заменять так же, как правило, на серин, с целью повышения устойчивости молекулы к окислению и предупреждению аномального перекрестного сшивания или для создания точек для конъюгации с цитотоксическим или цитостатическим соединением. И наоборот, можно вводить в антитело цистеиновую(ые) связь(и) для повышения его стабильности (особенно если антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Один из типов создаваемого путем замены варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельного участка родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный(ые) в результате вариант(ы), отобранный(е) для дальнейшего усовершенствования, должен(ны) обладать улучшенными биологическими свойствами относительно родительского антитела, из которого оно(они) получено(ы). Приемлемый путь получения таких вариантов на основе замены включает созревание аффинности с использованием фаговой презентации. В целом, метод состоит в следующем: несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации, получая все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антитела презентуются в одновалентной форме на поверхности частиц нитчатого фага в виде слияний с продуктом гена III фага M13, который присутствует в каждой частице. Варианты, которые презентуются фагом, затем подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания). Для того чтобы выявлять перспективные с точки зрения модификации сайты гипервариабельного участка, можно осуществлять сканирующий мутагенез аланином с целью идентификации остатков гипервариабельного участка, которые наиболее важны для связывания антигена. В альтернативном или дополнительном варианте может оказаться целесообразным анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело с целью выявления точек соприкосновения между антителом и человеческим CD40. Такие остатки в точках соприкосновения и соседние остатки являются кандидатами для замены с помощью способов, разработанных при создании настоящего изобретения. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, представленному в данном описании, и антитела с улучшенными свойствами по данным одного или нескольких соответствующих анализов отбирают для дальнейшей разработки.

Другим типом получения аминокислотного варианта антитела является изменение исходной схемы гликозилирования антитела. Под "изменением" подразумевают делецию одного или нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, не присутствующих в антителе.

Иногда может потребоваться модифицировать антитела, добавляя сайты гликозилирования. Гликозилирование антител обычно происходит посредством либо N-связывания, либо O-связывания. N-связывание предусматривает присоединение углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X обозначает любую аминокислоту кроме пролина, представляют собой распознаваемые последовательности, предназначенные для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Так, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование предусматривает присоединение одного из сахаров, таких как N-ацетилгалактозамин, галактоза или ксилоза, к гидроксикамислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя можно применять также 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Таким образом, для гликозилирования данного белка, например, антитела, создают аминокислотную последовательность белка, которая содержит одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-гликозилирования). Изменение может также представлять собой добавление или замену одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотных последовательностей антитела к CD40, получают с помощью различных методов, известных в данной области. Эти мето-

ды включают (но, не ограничиваясь только ими) выделение из природного источника (в случае встречающихся в естественных условиях вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью мутагенеза с использованием олигонуклеотидов (или сайтнаправленного мутагенеза), ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученного ранее варианта или не являющейся вариантом версии антитела к CD40.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и методы рекомбинации.

Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую требуемую форму антитела к CD40, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты, димерные антитела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Полинуклеотид(ы), который(ые) содержит(ат) последовательность, кодирующую гуманизированное антитело к CD40 или его фрагмент, или цепь, можно сливать с одной или несколькими регуляторными или контролирующими последовательности, известными в данной области, и можно включать в приемлемые экспрессионные векторы или клетку-хозяина, известные в данной области. Каждую из молекул полинуклеотида, кодирующего вариабельные области тяжелой или легкой цепи, можно независимо друг от друга сливать с полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует константный домен, например человеческий константный домен, что позволяет получать интактное антитело. Полинуклеотиды или их участки можно сливать вместе, создавая матрицу для получения одноцепочечного антитела.

Для получения с помощью методов рекомбинации полинуклеотид, кодирующий антитело, встраивают в реплицируемый вектор для клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. Известно и доступно много приемлемых векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компонентами вектора, как правило, являются один или несколько следующих элементов: сигнальная последовательность, сайт инициации репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминатора транскрипции.

Гуманизированные антитела к CD40 можно получать также в виде слитых полипептидов, в которых антитело сливают с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, несущий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, как правило, представляет собой последовательность, которая распознается и процессируется (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не могут распознавать и процессировать сигнальную последовательность гуманизированного антитела к CD40, сигнальную последовательность можно заменять на прокариотическую сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, лидерные последовательности щелочной фосфатазы, пенициллиназы, липопроотеина или термостабильного энтеротоксина II и т.п. Для секреции из дрожжей нативную сигнальную последовательность можно заменять, например, на лидерную последовательность, полученную из α -фактора дрожжевой инвертазы (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), или лидерную последовательность щелочной фосфатазы, глюкоамилазы *S.albicans* или сигнальную последовательность, описанную в WO 90/13646. Для экспрессии в клетках млекопитающих можно применять сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD-сигнал вируса герпеса простого. ДНК, кодирующую указанную область-предшественник, лигируют в рамке считывания с ДНК, которая кодирует гуманизированное антитело к CD40.

Экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеотидную последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает репликацию вируса, не зависящую от хромосомной ДНК хозяина, и она включает сайт инициации репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Сайт инициации репликации из плазмиды pBR322 пригоден для большинства грамотрицательных бактерий, сайт инициации плазмиды 2 μ пригоден для дрожжей, а различные вирусные сайты инициации (SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV (вирус везикулярного стоматита) или BPV (вирус папилломы крупного рогатого скота)) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Как правило, для экспрессионных векторов млекопитающих не требуется компонент, представляющий собой сайт инициации репликации (как правило, можно применять только сайт инициации репликации SV40, поскольку он содержит ранний промотор).

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать ген, который кодирует селективируемый маркер, для облегчения идентификации или экспрессии. Как правило, гены селективируемых маркеров кодируют белки, которые обуславливают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, таким как ампициллин, неомицин, метотрексат или тетрациклин, или в другом варианте восполняют ауксотрофную недостаточность, или в другом варианте пополняют имеющие решающее значение питательные вещества, которые не присутствуют в комплексных средах, например ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

В одной из приведенных в качестве примерах схем селекции применяют лекарственное средство

для прекращения роста клетки-хозяина. В тех клетках, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, образуется белок, обуславливающий устойчивость к лекарственному средству, и поэтому клетки выживают при такой схеме селекции. Примерами лекарственных средств, применяемых для такой доминантной селекции, являются неомицин, микофеноловая кислота и гиромоцин. Общепринятыми селективируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются маркеры, позволяющие идентифицировать клетки, компетентные в отношении поглощения нуклеиновой кислоты, которая кодирует гуманизированное антитело к CD40, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II (например, гены металлотионеина приматов), аденозиндеаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.п. Клетки, трансформированные применяемым для селекции геном DHFR, идентифицируют прежде всего путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Приемлемой клеткой-хозяином, когда применяют DHFR дикого типа, является клетка яичника китайского хомячка (CHO) с дефицитом DHFR-активности (например, DG44).

В альтернативном варианте клетки-хозяева (прежде всего хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный ген DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, которые кодируют антитело к CD4, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать по признаку роста клетки в среде, содержащий селективирующий агент для селективирующего маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418 (см., например, US 4965199).

Когда получение методом рекомбинантной ДНК осуществляют с использованием дрожжевой клетки в качестве клетки-хозяина, то в качестве маркера можно применять ген TRP1, который присутствует в полученной из дрожжей плазмиде YRp7 (Stinchcomb и др., *Nature*, 282, 1979, с. 39). Ген TRP1 является селективирующим маркером для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в среде с добавлением триптофана, например штамма ATCC 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85, 1977, с. 12). Наличие повреждения в *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина в результате обеспечивает эффективное окружение для выявления трансформации по признаку роста в отсутствие триптофана. Аналогично этому штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2r*, такие как ATCC 20,622 и 38,626, дополняют с помощью известных плазмид, несущих ген *LEU2*.

Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды pKD1 размером 1,6 мкм, можно применять для трансформации дрожжей *Kluveromyces*. С другой стороны, известна экспрессионная система для крупномасштабного получения рекомбинантного телячьего химозина в *K.lactis* (Van den Berg, *Bio/Technology* 8, 1990, с. 135). Описаны также стабильные мультиметрические экспрессионные векторы для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина с помощью промышленных штаммов *Kluveromyces* (Fleeg и др., *Bio/Technology* 9, 1991, с. 968-975).

Экспрессионные и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело к CD40 или его полипептидную цепь. Промоторы, которые пригодны для применения в прокариотических клетках-хозяевах, представляют собой промотор *rhoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, промоторные системы щелочной фосфатазы, триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Промоторы, предназначенные для применения в бактериальных системах, содержат также последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, которая кодирует гуманизированное антитело к CD40.

Известны многие промоторные последовательности эукариот. Фактически все гены эукариот имеют богатую АТ область, локализованную примерно на расстоянии 25-30 оснований против хода транскрипции от сайт инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная на расстоянии 70-80 оснований от сайта инициации транскрипции многих генов, представляет собой CNCAAT-область, в которой N может обозначать любой нуклеотид. На 3'-конце большинства генов эукариот находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности можно встраивать в эукариотические экспрессионные векторы.

Примеры промоторных последовательностей, которые можно применять в дрожжевых клетках-хозяевах, включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы имеют дополнительное преимущество, связанное с транскрипцией, которая контролируется условиями роста. Они включают дрожжевые промоторные области алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, расщепляющих ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Кроме того, приемлемые векторы и промоторы, которые можно применять при экспрессии в дрожжах, описаны в EP 73657. Энхансеры из дрожжей целесообразно применять также в сочетании с промоторами из дрожжей.

Транскрипцию гуманизированного антитела к CD40 с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируют, например, с помощью промоторов, полученных из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например из промотора актина или промотора иммуноглобулина, и из промоторов теплового шока при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 целесообразно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, получая при этом также сайт инициации репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор человеческого цитомегаловируса целесообразно получать в виде рестрикционного HindIII E-фрагмента. Система экспрессии ДНК в клетках-хозяевах млекопитающих, в которой применяли вирус бычьей папилломы в качестве вектора, описана в US 4419446. Модификация указанной системы описана в US 4601978 (см. также у Reyes и др., Nature 297, 1982, с. 598-601 описание экспрессии кДНК человеческого р-интерферона в мышинных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса герпеса простого). В другом варианте в качестве промотора можно применять длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Другим важным элементом, который можно применять в рекомбинантном экспрессионном векторе, является энхансерная последовательность, которую используют для повышения транскрипции ДНК, кодирующей гуманизированное антитело к CD40, в высших эукариотических организмах. Известны многие энхансерные последовательности генов млекопитающих (генов глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, применяют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примерами являются энхансер SV40, расположенный на удаленной стороне сайта инициации репликации (пары оснований 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы, расположенный на удаленной стороне сайта инициации репликации, и энхансеры аденовирусов (см. также у Yaniv Nature 297, 1982, с. 17-18 описание энхансерных элементов, применяемых для активации эукариотических промоторов). Энхансер можно встраивать путем сплайсинга в вектор в 5'- или 3'- положение относительно кодирующей последовательности антитела к CD40, но предпочтительно его помещают в сайт, расположенный в 5'-направлении относительно промотора.

Экспрессионные векторы, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетки дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, людей или содержащие ядро клетки других многоклеточных организмов), должны содержать также последовательности, необходимые для терминирования транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно получают из 5'- и иногда из 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой области мРНК, которая кодирует антитело к CD40. Одним из пригодных компонентов терминирования транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста (см. WO 94/11026 и представленный в указанной заявке экспрессионный вектор). Гуманизированные антитела к CD40 можно экспрессировать с помощью системы CHEF (см., например, US 5888809, описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки).

Приемлемыми клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, указанных в настоящем описании, являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Приемлемыми прокариотами являются (но, не ограничиваясь ими) эукариотические бактерии (эубактерии), такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например сем. Enterobacteriaceae, такие как E.coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B.subtilis и B.licheniformis (например, штамм B.licheniformis 41P, описанный в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P.aeruginosa, и Streptomyces. Одним из предпочтительных штаммов E.coli, который применяют в качестве хозяина, является штамм E.coli 294 (ATCC 31,446), хотя можно использовать и другие штаммы E.coli B, E.coli X1776 (ATCC 31,537) и E.coli W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры приведены в качестве иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют гуманизированное антитело к CD40, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Наиболее часто применяемым низшим эукариотическим микроорганизмом-хозяином является Saccharomyces cerevisiae, т.е. обычные пекарские дрожжи. Однако согласно настоящему изобретению можно применять многочисленных известных и доступных представителей других родов, видов и штаммов, таких как Schizosaccharomyces pombe; хозяев из сем. Kluyveromyces таких, например, как K.lactis, K.fragilis (ATCC 12,424), K.bulgaricus (ATCC 16,045), K.wickerhamii (ATCC 24,178), K.waltii (ATCC 56,500), K.drosophilum (ATCC 36,906), K.thermotolerans и K.marxianus; Yarrowia (EP 402226); Pichia pastoris (EP 183070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244234); Neurospora crassa (Case и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, с. 5259-5263); Schwanniomycetes, таких как Schwanniomycetes occidentalis; и нитчатые грибы, такие, например, как Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и хозяев р. Aspergillus, таких как A.nidulans и A.niger.

Клетки-хозяева, пригодные для экспрессии гликозилированного гуманизированного антитела к CD40, получают из многоклеточных организмов. Примерами клеток беспозвоночных являются клетки растений и клетки насекомых, например многочисленные бакуловирусные штаммы и их варианты и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая муха) и *Bombyx mori* (шелковичный червь). Широко известны разнообразные штаммы вирусов, которые можно использовать для трансфекции, например вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм *Bombyx mori* Bm-5 NPV, и такие вирусы можно применять, прежде всего, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака.

Экспрессию гуманизированного антитела к CD40 можно осуществлять в клетках позвоночных животных. В настоящее время размножение клеток позвоночных в культуре (культура ткани) стало стандартной процедурой, и соответствующие методики являются широко распространенными. Примерами пригодных в качестве хозяев линий клеток млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/DHFR (CHO, Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, с. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1, ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, с. 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с помощью описанных выше экспрессионных или клонирующих векторов с целью получения гуманизированного антитела к CD40 и культивируют в пригодных питательных средах, соответствующим образом модифицированных для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

Клетки-хозяева, которые применяют для получения гуманизированного антитела к CD40, представленного в настоящем описании, можно культивировать в широком разнообразии сред. Для культивирования клеток-хозяев можно использовать имеющиеся в продаже среды, такие как среда Хэма F10 (фирма Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, шт. Миссури), минимальная поддерживающая среда ((MEM), фирма Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (фирма Sigma-Aldrich Co.) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), фирма Sigma-Aldrich Co.). Кроме того, в качестве сред для культивирования клеток-хозяев можно использовать любые из сред, которые описаны в одной или нескольких следующих публикациях: Ham и др., Meth. Enz. 58, 1979, с. 44, Barnes и др., Anal. Biochem. 102, 1980, с. 255, US 4767704, US 4657866, US 4927762, US 4560655, US 5122469, WO 90/103430 и WO 87/00195. Любую из этих сред при необходимости можно дополнять гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид и фосфат натрия, кальция, магния), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (т.е. неорганическими соединениями, которые обычно присутствуют в конечных концентрациях, находящихся в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что можно включать также любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, такие как температура, значение pH и т.п., представляют собой условия, которые использовались ранее для клеток-хозяев, отобранных для экспрессии, и они должны быть очевидны обычному специалисту в данной области.

При использовании методов рекомбинации антитело может продуцироваться внутри клетки, в периплазматическом пространстве или непосредственно выделяться в среду. Если антитело продуцируется внутри клетки, то на первой стадии клетки можно разрушать для высвобождения белка. Состоящий из отдельных частиц дебрис, либо из клеток-хозяев, либо из лизированных фрагментов, можно удалять, например, с помощью центрифугирования или ультрафильтрации. У Carter и др., Bio/Technology, 10, 1992, с. 163-167 описан метод выделения антител, секретируемых в периплазматическое пространство *E.coli*. В целом, метод состоит в следующем: клеточную массу в виде пасты подвергают оттаиванию приблизительно в течение 30 мин в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТК и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Клеточный дебрис можно удалять центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, то супернатанты таких экспрессионных систем, как правило, сначала концентрируют с помощью имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белков, например устройства для ультрафильтрации типа Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предыдущих стадий для ингибирования протеолиза можно добавлять ингибитор протеазы, такой как ФМСФ, а для предупреждения увеличения

нежелательных примесей можно добавлять антибиотики. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно применять широкое разнообразие методов.

Композицию антитела, полученную из клеток, можно очищать, например, хроматографией на гидроксипатите, гель-электрофорезом, диализом и аффинной хроматографией, при этом предпочтительным методом очистки является аффинная хроматография. Возможность применения белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-области любого иммуноглобулина, присутствующей в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основой которых являются человеческие тяжелые гамма1-, гамма2- или гамма4-цепи (Lindmark и др., *J. Immunol. Meth.*, 62, 1983, с. 1-13). Белок G рекомендуется для применения для всех мышинных изотипов и для человеческой гамма3-цепи (Guss и др., *EMBO J.*, 5, 1986, с. 1567-1575). В качестве матрицы, с которой связывается аффинный лиганд, наиболее часто применяют агарозу, однако можно использовать и другие матрицы. Устойчивые к механическим воздействиям матрицы, такие как стекло или поли(стиролдивинил)бензол с контролируемым размером пор, позволяют достигать более высоких скоростей потока и более короткого времени процесса по сравнению с характеристиками, достигаемыми при использовании агарозы. Если антитело содержит C_H3-домен, то для очистки можно использовать смолу типа Bakerbond ABX™ (фирма J.T.Baker, Филлипсбург, шт. Нью-Джерси). В зависимости от антитела, подлежащего выделению, можно применять также другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ЖХВР с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматографии на анионо- или катионообменной смоле (например на колонке с полиаспартамовой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония.

После любой из предыдущей(их) стадии(й) очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и примеси, можно подвергать хроматографии, основанной на гидрофобном взаимодействии, при низком значении pH с использованием буфера для элюции, который имеет значение pH приблизительно от 2,5 до 4,5, хроматографию предпочтительно осуществляют при низких концентрациях солей (например, с использованием приблизительно 0-0,25М солей).

В контексте настоящего описания понятия "идентичный" или "процент идентичности" касательно двух или большего количества нуклеотидных или полипептидных последовательностей относится к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, можно интродуцировать бреши в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности для оптимального сравнительного анализа первичной структуры со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда в положении в первой последовательности находится такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в указанном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений) × 100). Две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после интродукции при необходимости брешей в последовательности (например, исключая дополнительную последовательность, простирающуюся за последовательности, подлежащие сравнению). Например, когда сравнивают последовательности переменных областей, то лидерные и/или последовательности константных доменов не рассматриваются. При сравнении последовательностей двух последовательностей, "соответствующий" CDR относится к CDR, расположенному в одинаковом положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять для сравнения двух последовательностей, является (но, не ограничиваясь только ими) алгоритм Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1990, с. 2264-2268, модифицированный согласно описанному у Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, сс. 5873-5877. Указанный алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, описанные у Altschul и др., *J. Mol. Biol.* 215, 1990, с. 403-410. Анализ нуклеотидов с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, в которой балл = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей представляющей интерес белок. Анализ белков с помощью BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющему интерес белку. Для осуществления сравнительных анализов первичной структуры, включающей бреши, можно применять программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др., *Nucleic Acids*, 25, 1997, с. 3389-3402. В другом варианте можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, позволяющего определять отдаленные взаимосвязи между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять задаваемые по умолчанию параметры соответст-

вующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным примером (но, не ограничиваясь только им) математического алгоритма, который можно применять для сравнения последовательностей, является алгоритм, описанный у Myers и Miller, CABIOS, 1989. Указанный алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ для сравнительного анализа первичной структуры последовательностей GCG. Когда программу ALIGN применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, то можно применять таблицу взвешенных остатков PAM120, штраф за длину бреши 12 и штраф за брешь 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, описанные у Torellis и Robotti, Comput. Appl. Biosci. 10, 1994, с. 3-5; и FASTA, описанный у Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 2444-2448. В программе FASTA параметр ktp обозначает контрольный параметр, который задает чувствительность и скорость поиска. Если ktp = 2, то сходные области в двух подлежащих сравнению последовательностях выявляют путем просмотра пар выравненных остатков; если ktp = 1, то оценивают индивидуальные выравненные аминокислоты. Для белковых последовательностей можно задавать значение ktp, равное 2 или 1, а для последовательностей ДНК значения в пределах от 1 до 6. В альтернативном варианте сравнительный анализ первичной структуры белковых последовательностей можно осуществлять с помощью алгоритма CLUSTAL W, описанного у Higgins и др., Methods Enzymol. 266, 1996, с. 383-402.

Нетерапевтическое применение.

Антитела, представленные в настоящем описании, можно применять в качестве средств, используемых для очистки на основе аффинности. При осуществлении этого процесса антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола, содержащая белок А, с помощью методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело приводят в контакт с образцом, содержащим белок CD40 (или его фрагмент), который подлежит очистке, и затем подложку отмывают приемлемым растворителем, который должен удалять практически весь материал в образце, кроме белка CD40, связанного с иммобилизованным антителом. И, наконец, подложку отмывают другим приемлемым растворителем, который должен отделять белок CD40 от антитела.

Гуманизированные антитела к CD40 можно применять также в диагностических анализах для выявления и/или количественной оценки белка CD40, например, путем определения экспрессии CD40 в конкретных клетках, тканях или сыворотке.

Для диагностических целей антитело целесообразно метить с помощью выявляемого фрагмента. Известны и доступны многочисленные выявляемые метки, такие как радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки, представляющие собой субстраты для ферментов и т.п. Метку можно опосредованно конъюгировать с антителом с помощью различных известных методик. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любую из указанных выше меток, относящихся к трем широким категориям, можно конъюгировать с авидином, или наоборот. Биотин избирательно связывается с авидином и поэтому метку можно конъюгировать с антителом опосредованным образом. В альтернативном варианте для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело можно конъюгировать с небольшим гаптеном (таким как дигоксин) и одну из различных типов указанных выше меток конъюгировать с антителом к гаптену (например, антителом к дигоксину). Таким образом можно осуществлять опосредованную конъюгацию метки с антителом.

Примерами радиоизотопных меток являются ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно метить радиоизотопом с помощью методик, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, т. 1 и 2, 1991, под ред. Coligen и др., изд-во Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1991. Радиоактивность можно измерять, например, с помощью сцинтилляционного счетчика.

Примерами флуоресцентных меток являются известные метки, полученные на основе хелатов редкоземельных металлов (хелаты европия), или метки на основе флуоресцеина и его производных, родамина и его производных, дансила, лиссамина, фикоэритрина и техасского красного. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом с помощью известных методик, например, описанных в Current Protocols in Immunology, выше. Флуоресценцию можно оценивать количественно с помощью флуориметра.

В данной области известны различные хорошо охарактеризованные фермент-субстратные метки (см., например, обзор, приведенный в US 4275149). Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно оценивать с помощью различных методик. Например, изменение может представлять собой изменение цвета субстрата, которое можно оценивать спектрофотометрически. В другом варианте фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методики количественной оценки флуоресценции описаны выше. В результате химической реакции в хемилюминесцентном субстрате возникает электронно-возбужденное состояние, вследствие чего он может испускать свет, который можно оценивать, например, с помощью хемилюминометра, или он является донором энергии для флуоресцентного акцептора.

Примерами ферментативных меток являются люциферазы, такие как люцифераза светляка и бактериальная люцифераза (US 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназа, уреазы, пероксидазы, например пероксидаза из хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, оксидазы сахаридов (такие как оксидаза глюкозы, оксидаза галактозы и глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и оксидаза ксантина), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Методики конъюгации ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan и др., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, в: *Methods in Enzym.*, под ред. J. Langone и H. Van Vunakis, изд-во Academic press, N.Y., 73, 1981, с. 147-166.

Примерами комбинаций фермент-субстрат являются, например: пероксидаза из хрена (HRPO) и гидрогенпероксидаза в качестве субстрата, при этом гидрогенпероксидаза окисляет краситель-предшественник, такой как ортофенилендиамин (OPD) или гидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ); щелочная фосфатаза (AP) и пара-нитрофенилфосфонат в качестве хромогенного субстрата; и β -D-галактозидаза (β -D-Gal) и хромогенный субстрат, такой, например, как пара-нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флуорегенный субстрат, такой как 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

Специалистам в данной области известны многочисленные другие комбинации фермент-субстрат. Общий обзор представлен, например, в US 4275149 и US 4318980.

Гуманизированное антитело к CD40 можно применять в немеченом виде и выявлять с помощью меченого антитела, связанного с гуманизированным антителом к CD40.

Антитела можно применять в любом известном методе анализа, таком как конкурентные анализы связывания, прямые и косвенные сэндвич-анализы и анализы на основе иммунопреципитации (см., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, изд-во CRC Press, Inc., 1987, с. 147-158).

Диагностические наборы.

Можно применять гуманизированное антитело к CD40, входящее в состав диагностического набора, представляющего собой упаковку, которая содержит комбинацию реагентов, взятых в предварительно определенных количествах, в сочетании с инструкциями по осуществлению диагностического анализа. Если антитело мечено ферментом, то набор может включать необходимые для фермента субстраты и кофакторы, такие как субстрат-предшественник, образующий выявляемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы и буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьироваться в широких пределах, обеспечивая концентрации реагентов в растворе, которые в значительной степени оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут представлять собой сухие порошки, как правило, лиофилизированные, включая эксципиенты, которые при растворении должны образовывать раствор реагента, имеющий соответствующую концентрацию.

Терапевтическое применение.

Гуманизированное антитело к CD40, представленное в настоящем описании, можно применять для лечения различных нарушений, ассоциированных с экспрессией CD40, которые указаны в настоящем описании.

Гуманизированное антитело к CD40 или агент вводят любыми приемлемыми путями, включая парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, внутрилегочный и внутриносовой пути введения и, если требуется местное иммуносупрессорное лечение, путем введения в пораженную область (включая перфузию или другой путь обеспечения контакта трансплантата с антителом перед трансплантацией). Гуманизированное антитело к CD40 или агент можно вводить, например, с помощью инфузии или болюса. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, гуманизированное антитело к CD40 можно вводить путем пульсирующей инфузии, прежде всего понижающими дозами антитела. Дозирование можно осуществлять путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, в том числе в зависимости от того является ли обработка кратковременной или пролонгированной.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза антитела должна зависеть от ряда факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, серьезность и процесс течения заболевания, вводят ли антитело для профилактических или терапевтических целей, предшествующая терапия, история болезни пациента и ответ на антитело, а также от предписания лечащего врача. Антитело можно вводить пациенту однократно или путем серий обработок.

В зависимости от типа и серьезности заболевания примерно от 1 мкг/кг до 20 мг/кг (например, примерно 0,1-15 мг/кг/дозу) антитела можно сначала вводить пациенту в виде начальной предполагаемой дозой, путем, например, одного или нескольких введений или путем непрерывной инфузии. Как правило, суточная доза должна составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от указанных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода времени, в зависимости от состояния, лечение продолжают до требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. Однако можно применять другие схемы введения доз. Успех указанной терапии легко оценивать общепринятыми методами и анализами. Пример схемы введения доз представлен в WO 94/04188.

В контексте описания понятие "подавление" имеет такое же значение, что и понятия "облегчение" и "купирование", и относится к ослаблению одной или нескольких характеристик заболевания.

Композицию антитела можно включать в препаративную форму, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Важные в этом плане факторы включают конкретное нару-

шение, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину нарушения, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам. В этой связи "терапевтически эффективное количество" антитела, подлежащего введению, регулируют таким образом, чтобы оно представляло собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, облегчения или лечения нарушения, ассоциированного с экспрессией CD40.

Антитело необязательно, но в определенных случаях, включают в препаративную форму в сочетании с одним или несколькими агентами, применяемыми в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества гуманизированного антитела к CD40, присутствующего в препаративной форме, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Их, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием таких же путей введения, в которых их применяли ранее, или с использованием в дозе, составляющей примерно от 1 до 99% от их принятых для применения доз.

Ассоциированные с CD40 нарушения.

Антитела к CD40 или агенты можно применять для лечения или предупреждения рака, при котором происходит экспрессия CD40, или иммунологического нарушения, характеризующегося экспрессией CD40, например несоответствующей активацией иммунных клеток (например, лимфоцитов или дендритных клеток). Указанная экспрессия CD40 может быть связана, например, с повышенными уровнями белка CD40 на клеточной поверхности и/или измененной антигенностью экспрессируемого CD40. Для лечения или предупреждения иммунологического нарушения с помощью способов, представленных в настоящем описании, вводят индивидууму, который нуждается в таком лечении или предупреждении, в эффективном количестве антитело к CD40 или агент, где антитело (I) связывается с активированными иммунными клетками, которые экспрессируют CD40 и которые ассоциированы с болезненным состоянием, и (II) обладает цитотоксическим, цитостатическим или иммуносупрессорным действием на активированные иммунные клетки.

Иммунологические заболевания, которые отличаются несоответствующей активацией иммунных клеток и которые можно лечить или предупреждать с помощью способов, предлагаемых в настоящем описании, можно классифицировать, например, по типу(ам) реакции(ий) гиперчувствительности, которая(ые) лежит(ат) в основе нарушения. Эти реакции, как правило, разделяют на 4 типа: анафилактические реакции, цитотоксические (цитолитические) реакции, иммунные комплексные реакции или реакции клеточно-опосредованного иммунитета (CMI) (которые обозначают также как реакции замедленной гиперчувствительности (DTH) (см., например, *Fundamental Immunology*, под ред. William E. Paul, изд-во Raven Press, N.Y., 3-е изд., 1993).

Конкретными примерами указанных иммунологических заболеваний являются ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), эндокринная офтальмопатия, увеит, системная красная волчанка, тяжелая псевдопаралитическая миастения, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое нарушение, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит), анафилаксия, аллергическая реакция, синдром Шегрена, сахарный диабет типа I, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиялгия, полимиозит, дерматомиозит, воспалительный миозит, множественная эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, воспаление надпочечника, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозная анемия, атрофия желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострая кожная красная волчанка, гипопаратиреоидизм, синдром Дресслера, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, пузырчатка обыкновенная, пузырчатка, дерматит герпетиформный, гнездная алопеция, пемфигоид, склеродерма, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, болезнь Рейно, эзофагит (нарушение моторики пищевода), склеродактилия и телеангиоэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкизирующий спондилит, неспецифический язвенный колит, смешанная соединительнотканная болезнь, нодозный полиартериит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическая атака, астма, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, экзогенный аллергический альвеолит, полиформная эритема, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, аллергия птицеловов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзный альвеолит, интерстициальное заболевание легких, узловатая эритема, гангренозная пиодермия, реакция на трансфузию, артерит Такаясу, ревматическая полимиалгия, преходящий артерит, шистосомоз, гигантоклеточный артерит, аскариоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзема, лимфоматозный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, лихорадка Денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойкая возвышающаяся эритема, псориаз, эритробластоз плода, эозинофильный фасциит, синдром Шулмана, синдром Фелти, филариоз, циклит, хронический циклит, гетерохронический циклит, циклит Фукса, IgA-нефропатия, пурпура Геноха-Шенлейна, реакция "трансплантат-против-хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатия, синдром Итона-Лэмберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемия,

макроглобулемия Вальденстрема, синдром Эванса, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, остеопороз, реакция замедленной гиперчувствительности и аутоиммунная гонадная дисфункция.

Таким образом, в настоящем описании предусмотрено применение антител CD40 для лечения нарушений В-лимфоцитов (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет типа I), Th₁-лимфоцитов (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез или реакция "трансплантат-против-хозяина") или Th₂-лимфоцитов (например, atopический дерматит, системная красная волчанка, atopическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Омена, системный склероз или хроническая реакция "трансплантат-против-хозяина"). Как правило, нарушения, включающие дендритные клетки, представляют собой нарушения Th₁-лимфоцитов или Th₂-лимфоцитов. Ревматоидный артрит (RA) представляет собой одно из наиболее распространенных воспалительных аутоиммунных заболеваний, которое поражает примерно 1% популяции. Хотя существуют эффективные средства лечения (например, MTX и анти-TNF агенты), существует также очень большая медицинская потребность в средствах против ревматоидного артрита, прежде всего для пациентов, которые не реагируют соответствующим образом на терапию с использованием антител к TNF (примерно 30% пациентов). Кроме того, вплоть до 50% пациентов прекращают лечение антагонистами TNF после их применения в течение 5 лет, главным образом из-за нежелательных явлений, но также и из-за повышение количества пациентов, у которых обнаружено снижение терапевтической пользы. Таким образом, важным является создание эффективных терапий, оказывающих направленное воздействие на воспаление и разрешение суставов при RA, но действие которых связано не только с непосредственным ингибированием TNF. Очень привлекательным подходом является целенаправленное костимулирующее воздействие на клеточные пути. Одной из имеющих решающее значение пар рецептор-лиганд при костимуляции является CD40/CD40L. Эта система обеспечивает взаимодействия между иммунными клетками и между иммунными и неиммунными клетками, которые все являются важными в патогенезе RA. Блокада CD40 с помощью антагонистического антитела может оказывать одно или несколько из следующих воздействий на RA:

- 1) ингибирует В-клеточную дифференцировку и переключение изотипа антитела;
- 2) ингибирует производство цитокинов и хемокинов и повышающую регуляцию адгезионных молекул в Т-клетках и макрофагах;
- 3) ингибирует активацию дендритных клеток и
- 4) ингибирует производство провоспалительных цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, простагландинов и понижающую регуляцию адгезионных молекул в неиммунных клетках (например, эпителиальных, эндотелиальных и мезенхимальных клетках).

Помимо RA композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее целесообразно применять в способах лечения рассеянного склероза, псориаза (включая псориатический артрит), ювенильного ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, системной красной волчанки и при трансплантации плотных органов.

Ревматоидный артрит (RA) представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание, которое превалирует примерно у 1% взрослых людей. Развитие болезни приводит к значительной распространенности болезни и преждевременной смертности (смертность главным образом связана с усилением сердечно-сосудистого заболевания). В настоящее время установлено, что повреждение суставов начинается на очень ранней стадии заболевания, у вплоть до 30% пациентов радиологически выявлена эрозия костной ткани в момент диагностирования, через 1 год это количество повышается до 60%. В настоящее время согласно руководствам назначается начальная терапия традиционными модифицирующими болезнь противоревматическими лекарственными средствами (DMARD) в течение 3 месяцев после установления окончательного диагноза. DMARD могут снижать или предупреждать повреждение суставов и сохранять функцию сустава. В настоящее время ревматологами выбран метотрексат (MTX) в качестве начальной DMARD-терапии для большинства пациентов.

Эффективными средствами лечения RA являются антагонисты TNF этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®), антагонист CTLA4 абатацепт (Orencia®) и МАт к IL-6-рецептору тоцилизумаб и МАт к CD20 ритуксимаб (Rituxan®). В современных руководствах, как правило, предложено применение биологических DMARD для лечения активного RA после неадекватного ответа на традиционные DMARD.

В современных исследованиях, проведенных на пациентах с ранним агрессивным RA без предшествующего лечения MTX, установлено, что комбинация MTX с антагонистом TNF обладает более высокой активностью по сравнению с применением каждого из указанных средств в виде монотерапии. Наиболее значительным результатом, выявленным по данным радиологического обследования, являлось выраженное благоприятное действие комбинированной терапии. Таким образом, комбинацию MTX и ингибиторов TNF можно применять для пациентов, которые имеют наиболее высокий риск возникновения агрессивного заболевания и агрессивного фенотипа (например, высокий балл активности, функциональное нарушение, серопозитивность по ревматоидному фактору (RF) или антитело к циклическому

цитрулиннированному пептиду (ССР), повышенный уровень С-реактивного белка (CRP), эрозии по данным радиографического обследования). Однако авторы настоящего изобретения предполагают, что является маловероятным применение в клинической практике антагонистов TNF в качестве первой линии терапии. Обследование, проведенное ревматологами США в апреле 2005 г., продемонстрировало, что факторами, которые оказывают наибольшее влияние на решение о применении антагонистов TNF, являлись: безуспешность лечения MTX или несколькими DMARD, физикальное глобальное обследование, функциональное нарушение и ухудшение или эрозии, выявленное при радиографическом обследовании. Известно, что в настоящее время в США 20% пациентов, страдающих RA, подвергались терапии на основе ингибиторов TNF.

Современные терапии, включая биологические терапии, не помогли в требуемой степени значительному проценту страдающих RA пациентов либо из-за непереносимости и токсичности лекарственной терапии, либо из-за отсутствия ответа. Вплоть до 50% пациентов прервали лечение антагонистом TNF в пределах 5 лет, главным образом, из-за нежелательных явлений, но также вследствие увеличения количества пациентов, у которых обнаружена потеря ответа на лечение.

Иммунологическое нарушение представляет собой опосредованное Т-клетками иммунологическое нарушение, такое как Т-клеточное нарушение, при котором ассоциированные с нарушением активные Т-клетки экспрессируют CD40. Антитела к CD40 или агенты можно применять для истощения указанных экспрессирующих CD40 активированных Т-клеток. Введение антител к CD40 или агентов может приводить к истощению экспрессирующих CD40 активированных Т-клеток, в то время как оставшиеся Т-клетки не истощаются в значительной степени под воздействием антитела к CD40 или агента. В этом контексте "не истощаются в значительной степени" означает, что истощающее действие затрагивает менее примерно 60% или менее примерно 70%, или менее примерно 80% покоящихся Т-клеток.

Антитела к CD40 и агенты, представленные в настоящем описании, можно применять также для лечения или предупреждения рака, для которого характерна экспрессия CD40. Для лечения или предупреждения рака, для которого характерна экспрессия CD40, с помощью способов, представленных в настоящем описании, вводят индивидууму, который нуждается в таком лечении или предупреждении, в эффективном количестве антитело к CD40 или агент, при этом антитело или агент (I) связывается с экспрессирующей CD40 раковой клеткой и (II) проявляет цитотоксическое или цитостатическое действие, приводящее к истощению или ингибированию пролиферации экспрессирующих CD40 раковых клеток.

Рак, для которого характерна экспрессия CD40, который можно лечить или предупреждать с помощью способов, представленных в настоящем описании, включает, например, лейкоз, например острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз или эритролейкоз), хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз; истинную полицитемию; лимфому (например, болезнь Ходжкина или неходжкинскую лимфому); множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; болезнь тяжелых цепей; солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, колоректальная карцинома, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовой железы, карцинома слюнной железы, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, саркома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, медуллобластома, нейробластома, ретинобластома, назофарингеальная карцинома или эзофагеальная карцинома).

Фармацевтические композиции и их введение.

Композицию, содержащую CD40-связывающий агент (например, антитело к CD40), можно вводить индивидууму, который страдает или имеет риск развития иммунологического нарушения или рака, для которого характерна экспрессия CD40. Понятие "индивидуум" в контексте настоящего описания означает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить CD40-связывающий агент, включая, например, человека и млекопитающих кроме человека, таких как приматы, грызуны и собаки. Антитела или агенты можно вводить индивидуально или в сочетании с другими композициями для профилактики или лечения иммунологического нарушения или рака, для которого характерна экспрессия CD40.

Композиции, предлагаемые в изобретении, можно применять в способах, предназначенных для снижения признаков и симптомов, индуцирующих большой клинический ответ и замедляющих развитие структурного повреждения у пациентов, которые страдают от умеренной до серьезной активной формой RA и которые не дают соответствующую реакцию на лечение только MTX. Примером применяемой в настоящее время такой терапии является: применение энбрела/хумиры (данные с использованием хуми-

ры и энбрела получены для двух различных популяций пациентов). Композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять вместо терапии на основе энбрела/хумиры или в сочетании с терапией на основе энбрела/хумиры для лечения индивидуумов, которые не реагируют на лечение только MTX. Композиции, предлагаемые в изобретении, обладают эффективностью, которая превышает эффективность энбрела +MTX для пациентов, не дающих соответствующую реакцию на лечение метотрексатом, что установлено, например, на основе следующих результатов: ACR20 (критерий Американской коллегии ревматологов) через 6 месяцев >85% для смеси соединения плюс MTX (GS: энбрел +MTX - 71% по сравнению с плацебо +MTX - 27%, хумира +MTX через 12 месяцев - 59% по сравнению с плацебо +MTX - 24%)*. Дополнительными критериями более высокой эффективности композиций, предлагаемых в изобретении, могут являться: ингибирование развития структурного повреждения в течение одного года, аналогичное достигаемому при применении энбрела (через 52 недели средний модифицированный индекс Шарпа для смеси хумира +MTX - 0,1 по сравнению с плацебо +MTX - 2,7)*. В следующих вариантах осуществления изобретения композиции вызывают "большой клинический" ответ, превышают ответ на энбрел, у пациентов, которые не давали соответствующий ответ на лечение метотрексатом, по данным, полученным на основе ACR70 (20% для хумиры + MTX, 4% для плацебо +MTX)*.

Эффективность композиций, предлагаемых в изобретении, можно оценивать по снижению признаков и симптомов, индукции большого клинического ответа и замедлению развития структурного повреждения у пациентов, которые страдают от умеренной до серьезной активной формой РА и которые не дают соответствующую реакцию на лечение только анти-TNF-агентами. Современный "золотой стандарт" (GS): биологическая терапия без антител к TNF. Предпочтительно для указанных индивидуумов композиции, предлагаемые в изобретении, обладают эффективностью, сопоставимой (не более низкой) с эффективностью средств биологической терапии, не включающих антитела к TNF (таким, например, как оренсия, ритуксан), при гистологическом сравнении образцов, полученных из организма пациентов, которые не давали соответствующий ответ на лечение антителом к TNF: ACR20 через 6 месяцев >50% по сравнению с соединением плюс DMARD (GS: оренсия + DMARD - 50% по сравнению с плацебо + DMARD - 20%). Композиции, предлагаемые в изобретении, ингибируют развитие структурного повреждения в течение 1 года по данным балльной оценки на основе рентгеноскопии эрозии суставов и сужение суставной щели, аналогично ритуксану (через 52 недели средний модифицированный индекс Шарпа для ритуксана + MTX - 1,0 по сравнению с плацебо + MTX - 2,31).

Известны различные системы введения и их можно использовать для введения CD40-связывающего агента. Методы интродукции включают (но не ограничиваются только ими) внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и оральный пути. CD40-связывающий агент можно вводить, например, путем инфузии, в виде болюса или инъекции, и его можно вводить вместе с другими биологически активными средствами, такими как химиотерапевтические средства. Введение может быть системным или местным. Введение, как правило, представляет собой подкожную инъекцию. Препаративные формы для таких инъекций можно приготавливать, например, в виде предварительно заполненных шприцев, и их можно применять с недельным интервалом.

Следует определять характеристики безопасности антител, предлагаемых в изобретении, и они предпочтительно включают один или несколько следующих показателей: отсутствие клинически значимых побочных взаимодействий с другими медикаментозными средствами, которые являются общепринятыми при лечении ревматоидного артрита (например, DMARD, стероиды, НСПВС); отсутствие более высокого уровня отмены по параметрам безопасности или переносимости по сравнению с энбрелом; уровень серьезных инфекций не выше, чем в случае применения анти-TNF-агентов или других общепринятых биологических средств; частота и/или серьезность реакций в области инъекций или реакцию на инфузию такие же как у энбрела; отсутствие развития устойчивости к лекарственному средству или минимальный уровень устойчивости (менее 5%) при повторяющихся циклах терапии; отсутствие нейтрализации антител или минимальная нейтрализация; отсутствие данных о повышенной агрегации/активации тромбоцитов, которые могут приводить к случаям тромбоэмболии *in vivo*, или дисфункции тромбоцитов/эндотелиальных клеток, что может приводить к кровотечению.

Композицию CD40-связывающего агента можно вводить с помощью инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, где имплантат состоит из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембрану, такую как мембрана из силастика, или волокно. Как правило, при введении композиции используют вещества, которые не абсорбируют антитело к CD40 или агент.

Антитело к CD40 или агент можно вводить с помощью системы с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления изобретения можно использовать насос (см. например, Langer, Science 249, 1990, с. 1527-1533; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14, 1989, с. 201; Buchwald и др., Surgery 88, 1980, с. 507; Saudek и др., N. Engl. J. Med., 321, 1989, с. 574), можно использовать полимерные материалы (см., например, Medical Applications of Controlled Release, под ред. Langer и Wise, изд-во CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, под ред. Smolen и Ball, изд-во Wiley, New York, 1984); Ranger и Peppas, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23, 1983, с. 61; см. также Levy и др., Science 228, 1985, с. 190; During и др., Ann. Neurol. 25, 1989, с. 351;

Howard и др., J. Neurosurg. 81, 1989, с. 105). У Langer, выше, обсуждены другие системы с контролируемым высвобождением.

Связывающий CD40 агент (например, антитело к CD40) можно применять в виде фармацевтических композиций, содержащих в терапевтически эффективном количестве связывающий агент и один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

Фармацевтическую композицию готовят согласно общепринятым процедурам с получением фармацевтической композиции, пригодной для внутривенного или подкожного введения человеку. Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтическое средство может содержать также солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как липокаин, для снятия боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо их смешивают с получением стандартной дозы лекарственного средства, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. В тех случаях, когда фармацевтическое средство предназначено для введения путем инфузии, то его можно разливать по бутылкам для инфузий, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В тех случаях, когда фармацевтическое средство вводят с помощью инъекции, то можно использовать ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для того, чтобы ингредиенты можно было перемешивать перед введением.

Кроме того, фармацевтическую композицию можно включать в фармацевтический набор, который содержит (а) контейнер с CD40-связывающим агентом (например, антителом к CD40) в лиофилизованной форме и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизованного антитела к CD40 или агента. Необязательно к указанному(ым) контейнеру(ам) может прилагаться уведомление в форме, утвержденной официальным агентством, разрешающим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в уведомлении отражено разрешение агентства на производство, применение или продажу с целью введения людям.

Количество связывающего CD40 агента (например, антитела к CD40), которое является эффективным для лечения или профилактики иммунологического нарушения или рака, для которого характерна экспрессия CD40, можно определять обычными методами клинических исследований. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, результаты которых могут способствовать определению оптимальных пределов доз. Точная доза для применения в препаративной форме также должна зависеть от пути введения и стадии развития иммунологического нарушения или рака, для которого характерна экспрессия CD40, и она должна приниматься на основе рекомендаций лечащего врача и обстоятельств, характерных для каждого пациента. Эффективные дозы можно определять путем экстраполяции на основе кривых дозовой зависимости, полученных по результатам опытов *in vitro* или на модельных тест-системах с использованием животных.

Например, токсичность и терапевтическую эффективность антитела к CD40 или агента можно определить в клеточных культурах или на экспериментальных животных стандартными фармацевтическими методами, используемыми для определения ED₅₀ (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Предпочтительным является связывающий CD40 агент (например, антитело к CD40), которое имеет высокий терапевтический индекс. В тех случаях, когда при применении связывающего CD40 агента обнаружены токсические побочные действия, то можно использовать систему введения, которая обеспечивает направленный перенос связывающего CD40 агента в область пораженной ткани, для сведения до минимума потенциального повреждения клеток, которые не экспрессируют CD40, и тем самым для снижения побочных действий.

Данные, полученные по результатам анализов на клеточных культурах и исследований на животных, можно использовать при определении предела доз, предназначенных для применения на человеке. Как правило, доза связывающего CD40 агента находится в пределах концентраций в кровотоке, которые включают ED₅₀, обладая при этом низкой токсичностью или не проявляя токсичности. Дозу можно варьировать в указанных пределах в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Для любого связывающего CD40 агента, используемого согласно способу, терапевтически эффективную дозу можно первоначально устанавливать по результатам анализов на клеточных культурах. Дозу можно определить, исходя из данных, полученных на животных моделях, достигая пределов концентраций в плазме крови, которые включают IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается ингибирование симптомов, составляющее половину от максимального) по данным, полученным на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодных доз для человека. Можно определять концентрации в плазме крови, например, с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения, ELISA и т.п.

Как правило, доза антитела к CD40 или связывающего CD40 агента, которую вводят пациенту с иммунологическим нарушением или с раком, для которого характерна экспрессия CD40, составляет

примерно от 0,1 до примерно 100 мг/кг веса тела индивидуума. Доза, вводимая индивидууму, составляет от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 15 мг/кг или от примерно 1 до примерно 10 мг/кг веса тела индивидуума.

Примерами доз являются (но не ограничиваются только ими) дозы, составляющие от 1 нг/кг до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза составляет примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 12 мг/кг, примерно 13 мг/кг, примерно 14 мг/кг, примерно 15 мг/кг или примерно 16 мг/кг. Дозу можно вводить, например, каждый день, раз в неделю (каждую неделю), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, раз в две недели или ежемесячно, каждые два месяца или каждые три месяца. В конкретных вариантах осуществления изобретения доза составляет примерно 0,5 мг/кг/неделю, примерно 1 мг/кг/неделю, примерно 2 мг/кг/неделю, примерно 3 мг/кг/неделю, примерно 4 мг/кг/неделю, примерно 5 мг/кг/неделю, примерно 6 мг/кг/неделю, примерно 7 мг/кг/неделю, примерно 8 мг/кг/неделю, примерно 9 мг/кг/неделю, примерно 10 мг/кг/неделю, примерно 11 мг/кг/неделю, примерно 12 мг/кг/неделю, примерно 13 мг/кг/неделю, примерно 14 мг/кг/неделю, примерно 15 мг/кг/неделю или примерно 16 мг/кг/неделю. В некоторых вариантах осуществления изобретения пределы доз составляют от примерно 1 мг/кг/неделю до примерно 15 мг/кг/неделю.

Фармацевтические композиции, содержащие связывающий CD40 агент, могут дополнительно включать терапевтическое средство, конъюгированное или неконъюгированное со связывающим агентом. Антитело к CD40 или связывающий CD40 агент можно вводить совместно с одним или несколькими терапевтическими средствами, применяемыми для лечения или профилактики иммунологических нарушений или рака, для которого характерна экспрессия CD40. Например, комбинированная терапия может включать цитостатический, цитотоксический препарат или иммуносупрессор. Также комбинированная терапия может включать, например, введение средства, мишенью которого является рецептор или рецепторный комплекс, отличный от CD40, расположенный на поверхности активированных лимфоцитов, дендритных клеток или экспрессирующих CD40 раковых клеток. Примером такого средства является второе антитело, направленное не на CD40, которое связывается с молекулой на поверхности активированного лимфоцита, дендритной клетки или экспрессирующей CD40 раковой клетки. Другим примером является лиганд, мишенью которого является такой рецептор или рецепторный комплекс. Как правило, указанное антитело или лиганд связывается с рецептором клеточной поверхности на активированном лимфоците, дендритной клетке или экспрессирующей CD40 раковой клетке и усиливает цитотоксическое или цитостатическое действие антитела к CD40 посредством передачи цитотоксического или цитостатического сигнала к активированному лимфоциту, дендритной клетке или экспрессирующей CD40 раковой клетке.

Такая комбинированная терапия может обладать аддитивным или синергетическим действием в отношении признаков заболевания (например, тяжести проявления симптома, количества симптомов или частоты рецидивов).

При применении схем лечения при комбинированном введении антитела к CD40 или связывающий CD40 агент вводят совместно с терапевтическим средством. При этом терапевтическое средство вводят до или после введения антитела к CD40 или связывающего CD40 агента, по меньшей мере, в течение от 1 ч до нескольких месяцев, например по меньшей мере в течение 1, 5, 12 ч, суток, недели, месяца или трех месяцев до или после введения антитела к CD40 или связывающего CD40 агента.

Пригодные классы цитотоксических средств или иммуносупрессоров включают, например, антитубулиновые средства, ауристатины (например, MMAE или MMAF), вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и тринуклеарные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, средства, повышающие чувствительность к химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, преформирующие соединения, антиметаболиты пуринов, пурамицины, средства, повышающие чувствительность к лучевой терапии, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка или т.п.

Конкретные цитотоксические средства или иммуносупрессоры представляют собой, например, андроген, антрамицин (АМС), аспарагиназу, 5-азацитидин, азатиоприн, блеомицин, бусульфид, бутионин сульфоксмин, камтотecin, карбоплатин, кармусти (BSNU), CC-1065, хлорамбуцил, цисплатин, колхицин, циклофосфамид, цитарабин, цитидин арабинозид, цитохалазин В, дакарбазин, дактиномицин (прежнее название актиномицин), даунорубин, декарбазин, доцетаксел, доксорубин, эстроген, 5-фтордезоксифуридин, 5-фторурацил, грамицидин D, гидроксимочевину, идарубин, ифосфамид, иринокан, ломустин (CCNU), меклоретамин, мелфалан, 6-меркаптопурин, метотрексат, митрамицин, митомицин С, митоксантрон, нитроимидазол, паклитаксел, пликатамин, прокарбазин, стрептозотин, тенопозид, 6-тиогуанин, тиотепу, топотекан, винбластин, винкристин, винорелбин, VP-16 и VM-16.

Терапевтический препарат может представлять собой цитотоксическое средство. Приемлемые ци-

цитотоксические средства включают (но не ограничиваются только ими) доластатины (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ, АЕВ или АЕVB), вещества, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, энединины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), пуромидины, алкалоиды барвинка, СС-1065, SN-38, топотекан, морфолинодоксорубин, ризоксин, цианморфолинодоксорубин, эхиномицин, комбретастин, нетропсин, эпотилон А и В, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, дискодермолит, элейтеробин или митоксантрон.

Цитотоксическое средство также может представлять собой общепринятое химиотерапевтическое средство, такое, например, как доксорубин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митоцин С или этопозид. Кроме того, эффективные препараты, такие как аналоги СС-1065, калихеамицин, майтанзин, аналоги доластатина 10, ризоксин и палитоксин, можно связать с антителами к CD40 или агентами на их основе.

Цитотоксическое или цитостатическое средство иногда представляет собой ауристатин Е (также известный в данной области как доластатин-10) или его производное. Как правило, производное ауристатина Е представляет, например, эфир, образованный ауристатином Е и кетокислотой. Например, ауристатин Е можно подвергнуть взаимодействию с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с получением соответственно АЕВ и АЕVB. Другие типичные производные ауристатина Е представляют собой АРР, ММАF и ММАЕ. Синтез и структура ауристатина Е и его производных описаны, например, в публикации заявки на патент США 2004-0157782 А1 и 2005-0238649; международной заявке РСТ/US03/24209, международной заявке РСТ/US02/13435 и в US 6884869; 6323315; 6239104; 6034065; 5780588; 5665860; 5663149; 5635483; 5599902; 5554725; 5530097; 5521284; 5504191; 5410024; 5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444; и 4486414; описание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Цитотоксическое средство может представлять собой вещество, связывающееся с малой бороздкой ДНК. (см., например, US 6130237). Например, связывающееся с малой бороздкой вещество может быть соединением СВ1 или энедином (например, калихеамицином).

Примерами антибулиновых средств являются (но, не ограничиваясь только ими) таксаны (например, Тахол® (паклитаксел), Тахотег® (доцетаксел)), Т67 (туларик), алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и доластатины (например, ауристатин Е, АРР, ММАF, ММАЕ, АЕВ, АЕVB). Другими антибулиновыми средствами являются производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастины, дискодермолит и элейтеробин.

Цитотоксическое средство может быть майтанзиноидом. Например, майтанзиноид представляет собой майтанзин или DM-1 (фирма ImmunoGen, Inc.; см. также Chauri и др., Cancer Res. 52, 1992, с. 127-131).

Иногда терапевтическое средство не является радиоактивным изотопом, а цитотоксическое средство или иммуносупрессор может быть антиметаболитом. Антиметаболит может представлять собой, например, антагонист пурина (например, азотиоприн или микофенолата мофетил), ингибитор дигидрофолатредуктазы (например, метотрексат), ацикловир, гангцикловир, зидовудин, видарабин, рибавирин, азидотимидин, цитидина арабинозид, амантадин, дидезоксиуридин, йоддезоксиуридин, поскамет или трифлуридин.

Цитотоксическое средство или иммуносупрессор может представлять собой такролимус, циклоспорин или рапамицин, также цитотоксическое средство можно выбрать из альдеслейкина, алемтузумаба, алитретиноина, аллопуринола, алтретамина, амифостина, анастрозола, триоксида мышьяка, бексаротена, калустерона, капецитабина, целекоксиба, кладрибина, дарбепозина альфа, денилейкина дифтитокса, декстразоксана, дромостанолон пропионата, эпирубина, эпоэтина альфа, эстрамустина, эксеместана, филграстима, флоксуридина, флударабина, фулвестранта, гемцитабина, гемтузумаба озогамидина, гозерелина, идарубина, ифосфамида, иматиниба мезилата, интерферона альфа-2а, иринотекана, летрозолола, лейковорина, левамизола, меклоретамина или азотистогоиприта, мегестрола, месна, метотрексата, метоксалена, митомицина С, митотана, нандролона фенпропионата, опрелвекина, оксалиплатина, памидроната, пегадемазы, пегаспаргазы, пегфилграстима, пентостатина, пипобромана, пликатамина, натриевой соли порфимера, прокарбазина, хинакрин, расбуриказы, ревлимид, сарграмостима, стрептозоцина, тамоксифена, темозоломида, тенипозид, тестолактона, тиогуанина, торемифена, тозитумомаба, трастузумаба, третиноина, урацилового иприта, валрубина, винбластина, винкристина, винорелбина и золедроната.

Лекарственное средство также может представлять собой гуманизованное моноклональное антитело к HER2; ритуксан (ритуксимаб; фирма Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния); химерное моноклональное антитело к CD20; оварекс (фирма AltaRex Corporation, шт. Массачусетс); панорекс (фирма Glaxo Wellcome, шт. Северная Каролина; мышиное антитело изотипа IgG2a); цетуксимаб эрбитукс (фирма Imclone Systems Inc., шт. Нью-Джерси; химерное антитело к EGFR; витаксин (фирма MedImmune, Inc., шт. Мэриленд); кампат I/H (фирма Leukosite, шт. Массачусетс; гуманизованное антитело изотипа IgG1); смарт MI95 (фирма Protein Design Labs., Inc., шт. Калифорния; гуманизованное антитело к CD33 изотипа IgG); LymphoCide (фирма Immunomedics, Inc., шт. Нью-Йорк; гуманизованное

ное антитело к CD22 изотипа IgG); смарт ID10 (фирма Protein Design Labs., Inc., шт. Калифорния; гуманизированное антитело к HLA-DR); онколим (фирма Techniclone, Inc., шт. Калифорния; меченное радиоактивной меткой мышинное антитело к HLA-DR10); алломун (фирма BioTransplant, шт. Калифорния; гуманизированное МАт к CD2); авастин (фирма Genentech, Inc., шт. Калифорния; гуманизированное антитело к VEGF); эпратузамаб (фирма Immunomedics, Inc., шт. Нью-Йорк и фирма Amgen, шт. Калифорния; антитело к CD22) и CEAcide (фирма Immunomedics, Inc.; гуманизированное антитело к CEA).

Другими пригодными антителами являются (но, не ограничиваясь только ими) антитела против следующих антигенов: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, антиген Льюиса Y, антиген Льюиса X, альфа-фетопrotein, CA 242, антиген плацентарной щелочной фосфатазы, специфический для предстательной железы антиген, антиген кислой фосфатазы предстательной железы, эпидермальный фактор роста, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, рецептор трансферрина, p97, MUC1-KLN, CEA, gp100, MART1, специфический антиген предстательной железы, рецептор IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, человеческий хорионический гонадотропин, CD38, муцин, P21, MPG и продукт онкогена Neu.

Терапевтическое средство может быть иммуносупрессором. Иммуносупрессор может представлять собой, например, ганцикловир, этанерцепт, такролимус, циклоспорин, рапамицин, циклофосфамид, азатиоприн, микофенолата мофетил или метотрексат. В другом варианте иммуносупрессор может представлять собой, например, глюкокортикоид (например, кортизол или альдостерон) или аналог глюкокортикоида (например, преднизон или дексаметазон).

Пригодными ингибиторами циклооксигеназы являются меклофенамовая кислота, мефенамовая кислота, капруфен, диклофенак, дифлунизал, фенбуфен, фенпрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, набуметон, напроксен, сулиндак, теноксикам, толметин и ацетилсалициловая кислота.

Пригодными ингибиторами липоксигеназы являются ингибиторы окисления-восстановления (например, производные катехолбутана, нордигидрогваяретовая кислота (NDGA), мазопрокол, фенидон, ланопален, индазолиноны, нафзатром, бензофуранол, алкилгидроксиамин) и соединения, не являющиеся ингибиторами окисления-восстановления (например, гидрокситиазолы, метоксиалкилтиазолы, бензопираны и их производные, метокситетрагидропиран, босвелликовая кислота и ацелированные производные босвелликовой кислоты и хинолинметоксифенилуксусная кислота, замещенная циклоалкилом) и предшественники ингибиторов окисления-восстановления.

Другими пригодными ингибиторами липоксигеназы являются антиоксиданты (например, фенолы, пропилгаллат, флавоноиды и/или встречающиеся в естественных условиях субстраты, содержащие флавоноиды, гидроксильные производные флавонов, флавонол, дигидроквещертин, лютеолин, галангин, оробол, производные халкона, 4,2',4'-тригидроксикалкон, ортоаминофенолы, N-гидроксимочевин, бензофуранолы, эбселен и вещества, которые повышают активность восстановительных селеноферментов), соединения, образующие комплекс с ионом железа (например, гидроксамовые кислоты и их производные, N-гидроксимочевин, 2-бензил-1-нафтол, катехолы, гидроксилмины, карнозол, тролокс С, катехол, нафтол, сульфасалазин, зилейтон, 5-гидроксиантралиновая кислота и 4-(омега-арилалкил)фенилалкановые кислоты), содержащие имидазол соединения (например, кетоканазол и интраканазол), фено-тиазины и производные бензопирана.

Следующими пригодными ингибиторами липоксигеназы являются ингибиторы эйкозаноидов (например, октадекатетраеновая, эйкозатетраеновая, докозатетраеновая, эйкозагексаеновая и докозагексаеновая кислоты и их эфиры, PGE1 (простагландин E1), PGA2 (простагландин A2), випростол, 15-моногидроксиэйкозатетраеновая, 15-моногидроксиэйкозатриеновая и 15-моногидроксиэйкозапентаеновая кислоты и лейкотриены B5, C5 и D5), соединения, оказывающие влияние на кальциевые потоки, фено-тиазины, дифенилбутиламины, верапамил, фускозид, куркумин, хлорогеновая кислота, кофеиновая кислота, 5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота (ETYA), гидроксифенилретирамид, лонапален, эскулин, диэтилкарбамазин, фенантролин, банкален, проксикромил, тиоэфиры, диаллилсульфид и ди(1-пропенил)сульфид. Антагонисты рецептора лейкотриенов включают кальцитриол, онтазоласт, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, эбселен, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, ONOONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, ONOONOLB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, ONOONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK and F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 и Teijin TEI-1338.

Изделия.

Изделие включает контейнер и этикетку. Приемлемыми контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и лабораторные пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая является эффективной для лечения конкретного состояния, и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, кон-

тейнер может представлять собой мешок или флакон для внутривенного раствора, имеющий запирающее устройство, проницаемое для инъекционной иглы для подкожного введения. Действующее вещество в композиции представляет собой гуманизированное антитело к CD40. На этикетке на контейнере или связанной с ним указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Изобретение описано ниже с помощью представленных примеров, которые не направлены на ограничение объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение гуманизированного антитела к CD40.

Мышиные антитела 20E2 и 2H11 представлены выше в табл. 1 и 2. Осуществляли полную гуманизацию клонов 20E2 и 2H11. Создавали библиотеку, в которой человеческие и мышиные остатки варьировали таким образом, чтобы в любом конкретном положении мог находиться либо человеческий, либо мышиный остаток. Создавали такую библиотеку для тех аминокислот, которые были различными в человеческой зародышевой линии и в мышином антителе. Отбирали только клоны, которые сохраняли функцию родительского мышиного антитела. Таким образом, антитело А, антитело В и антитело С представляли собой гуманизированные антитела, полученные из мышиного антитела 20E2 (антитело А и антитело В) или из 2H11 (антитело С), клонированные в каркасе человеческий IgG1-KO (КО="нокаут")/каппа. IgG1-KO имеет две мутации в Fc-области, Leu234Ala и Leu235Ala, которые уменьшают связывание FcγR и комплемента.

В результате такой гуманизации получали различные гуманизированные последовательности вариабельных областей тяжелых и легких цепей, которые представлены ниже

SEQ ID NO: 41 (последовательность вариабельной области легкой цепи):

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 42 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):

EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 43 (последовательность вариабельной области легкой цепи)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 44 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWAQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 45 (последовательность вариабельной области легкой цепи)

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI
IYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 46 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 47 (последовательность вариабельной области легкой цепи)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLI

YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 48 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS,

SEQ ID NO: 49 (последовательность варибельной области легкой цепи)
DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLL
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 50 (последовательность варибельной области легкой цепи)
EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS,

SEQ ID NO: 51 (последовательность варибельной области легкой цепи)
DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLL
IYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 52 (последовательность варибельной области легкой цепи)
DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLL
YWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGT
KVEIK,

SEQ ID NO: 53 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS
GNRIIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAM
DYWGQGTLVTVSS,

SEQ ID NO: 54 (последовательность варибельной области легкой цепи)
QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQKPGKAPKLWIYSTSNLAS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK,

SEQ ID NO: 55 (последовательность варибельной области легкой цепи)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK,

SEQ ID NO: 56 (последовательность варибельной области легкой цепи)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK,

SEQ ID NO: 57 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWMGRID
 PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 58 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPQGQLEWMGRID
 PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 59 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWMGRID
 PEDGDSKYAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 60 (установленная последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPQGQLEWIGRIDP
 EDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 YWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 61 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPQGQLEWMGRID
 PEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 62 (последовательность варибельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWMGRID
 PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 63 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWMGRID
 PEDGDTKFAPKFQGKVTMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGT
 GYWGQGTLLTVSS,

SEQ ID NO: 64 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDP
 EDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTLTVSS,

SEQ ID NO: 65 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDP
 PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTY
 GYWGQGTLTVSS,

SEQ ID NO: 66 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDP
 PEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTY
 GYWGQGTLTVSS,

SEQ ID NO: 67 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYYVHWVKQRPKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTTVSS,

SEQ ID NO: 68 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYVHWVKQRPKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTTVSS,

SEQ ID NO: 69 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYVHWVKQRPKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGKVTMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTTVSS,

SEQ ID NO: 70 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYVHWVKQAPKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTTVSS,

SEQ ID NO: 71 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYYVHWVKQRPKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTTVSS,

SEQ ID NO: 72 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHVVKQAPGKGLEWIGRIDPE
 DGDTKYDPKFQGKATMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTVTVSS,

SEQ ID NO: 73 (последовательность варибельной области тяжелой цепи)
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYIHVQVQAPGKGLEWMGRIDP
 EDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCTTSYYVGTYG
 YWGQGTTVTVSS,

SEQ ID NO: 74 (последовательность варибельной области легкой цепи) 1
 из антитела 10F2Hum:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLLIYSTSNLASG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK,

SEQ ID NO: 75 (последовательность варибельной области легкой цепи) 2
 из антитела 10F2Hum:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLLIYSTSNLASG
 VPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK,

SEQ ID NO: 76 (последовательность варибельной области легкой цепи)
 QIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSYILWFQKPGKAPKLWIYSTSNLAS
 GVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK.

Примерами гуманизированных антител, предлагаемых в настоящем изобретении, являются антитела, которые имеют последовательности тяжелых и легких цепей, представленные в приведенной ниже таблице. Выделенные жирным шрифтом подчеркнутые последовательности в приведенной ниже таблице соответствуют варибельным областям, а написанные обычным шрифтом неподчеркнутые последовательности соответствуют константным областям

Обозначение	Последовательность	SEQ ID NO:
Антитело А (легкая цепь)	DIVMTQSPD SLAVSLGERATMSCKSSQSLN SGNQKNYLTW HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGV PD RFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCNDYTYPLTFGGGTKVEIKR TV AAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26

Антитело А (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	27
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAELLGGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	28
Антитело А (тяжелая цепь, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAEEFEGGPSVFLFP KDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK	29
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTTLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	30
Антитело В (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYWTSSTRESGVPPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISSLQAEDVAVYYCQNDITYPLTFFGGGTKEIKRTVA</u> APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK KYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTTLTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	32

Антитело В (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Антитело В (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVEPKSGYPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
Антитело С (легкая цепь)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFOQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQORTFYPTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1KO)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYIVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYIVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Антитело С (Тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYIVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVEPKSGYPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1KOb)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYIVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED</u> <u>TAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGTLVTVSSASTKG</u> PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

Вариабельные области субклонировали в одном или двух различных пригодных для IgG экспрессионных векторах:

А) формат: человеческий IgG1-KO ("нокаут")/каппа с двойной мутацией Leu234Ala, Leu235Ala в Fc-области, что приводит к снижению эффекторной функции, такой как связывание FcγR и комплемента.

Б) формат: человеческий IgG4-DM (двойной мутант)/каппа с мутацией Ser228Pro в шарнирной области, которая снижает возникновение половинок молекул IgG4, а мутация Leu235Glu дополнительно уменьшает связывание FcγR.

Два антитела-кандидата, такие как антитело А и антитело В очищали и оценивали согласно следующим критериям:

Внешний вид, CCF (мутность).

Способность к фильтрации, CCF.

Выход на рекомбинантном белке А.

Мутность при оценке и нейтрализации.

Растворимые агрегаты (SEC).

Чистота/особенности загрязнения (ДСН).

Распределение зарядов (IEF).

Пример 2. Данные in vitro.

Антитело А, антитело В и антитело С характеризовали параллельно с антителами 4D11 (фирма Kirin/Astellas) и PG-102 (фирма PanGenetics), которые получали на основе опубликованных последовательностей. Данные для антитела А, антитела В, антитела С и 4D11 приведены ниже. Антитело PG-102 проявляло агонистическую активность и обладало только лишь способностью не полностью ингибировать пролиферацию В-клеток (данные не представлены). В табл. 2.2. обобщены полученные данные. Более подробное описание результатов представлено после табл. 2.2.

Таблица 2.2. Обобщение полученных in vitro данных, касающихся антитела А, антитела В и антитела С и антитела к CD40 фирмы Kirin 4D11

Параметр/анализ	Антитело А	Антитело В	Антитело С	4D11
Kd +/- hu сыворотка	<100пМ	<100пМ	<100пМ	<100пМ
Связывание с клетками (EC ₅₀ /нМ ± СКО)	1,2 (±0,28)	1,5 (±0,68)	1,7 (±0,28)	0,9 (±0,3)
Пролиферация В-клеток: антагонизм (IC ₅₀ /нМ±СКО)	0,3 (±0,13)	0,2 (±0,10)	0,1 (±0,004)	0,03 (±0,02)
Пролиферация В-клеток: агонизм: (SI*) (IC ₅₀ /нМ±СКО)	Агонизм отсутствует (SI <2)	Агонизм отсутствует (SI <2)	Агонизм отсутствует (SI <2)	Агонизм отсутствует (SI <2)
Дендритные клетки /IL-12/23p40: антагонизм (IC ₅₀ /нМ ± СКО)	< 1нМ	< 1нМ	< 1нМ	< 1нМ
Дендритные клетки /IL-12/23p40: Агонизм	Агонизм отсутствует	Агонизм отсутствует	Агонизм отсутствует	Агонизм отсутствует
Виды, для которых существует перекрестная реакция: связывание Hu/Суно (EC ₅₀ соотношения**)	3	2	1	Не изучали

SI, показатель стимуляции; ** соотношение >1 означает повышенную способность связываться с антигеном обезьяны циномопус (Суно) по сравнению с человеческим антигеном.

А. Связывание гуманизированных антител с клеточным CD40 и рекомбинантным белком CD40.

Специфическое связывание гуманизированных антител с клеточным CD40 анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием трансфектированных CD40 клеток линии НЕК29. Обнаружено зависящее от концентрации связывание антитела А, антитела В и антитела С. Данные, демонстрирующие сходный профиль связывания антител, представлены на фиг. 1Б. Значения EC₅₀ для антител, предлагаемых в настоящем изобретении, и антитела фирмы Kirin 4D11 все находились в одинаковом диапазоне на уровне ~1 нМ, что наиболее вероятно является пределом чувствительности метода вследствие высоких уровней CD40 в трансфектированных клетках. Специфическое связывание гуманизированных антител с клеточным CD40 на поверхности клеток линии Ramos также представляет собой зависящее от концентрации связывание. Антитела имеют несколько различающиеся профили связывания (см. фиг. 2) и значения EC₅₀, составляющие 0,21-1,22 нМ. Не обнаружено связывания на CD40-негативных клетках, таких как нетрансфектированные НЕК293-клетки или Т-клеточная линия HSB-2, что подтверждает избирательное связывание с CD40 (данные не представлены).

Аффинность связывания антитела А, антитела В и антитела С с человеческим белком CD40-Fc оценивали с помощью устройства ForteBio Octet и установлено, что оно характеризовалось значениями констант диссоциации (K_D), составляющими <100 пМ. В результате двухвалентности антитела и CD40-Fc эффект avidности препятствовал точному определению значений K_D, более низких чем 100 пМ. Кроме

того, связывание с CD40-Fc анализировали в отсутствии и в присутствии 50% человеческой сыворотки и не обнаружено существенного воздействия сыворотки на связывание (данные не представлены).

Б. Активность гуманизированных антител в анализах В-клеточной активации/пролиферации.

Активность гуманизированных антител оценивали с использованием анализа В-клеточной пролиферации, в котором человеческие В-клетки, полученные из периферической крови, стимулировали рекомбинантным CD40L в присутствии IL-2 и IL-4. Для антитела А, антитела В и антитела С обнаружена выраженная способность ингибировать пролиферацию В-клеток (см. фиг. 3А и 3Б). Сравнение кривых ингибирования и значений IC_{50} ВI-антител (антитела фирмы Boehringer Ingelheim International) и антитела фирмы Kirin 4D11 продемонстрировало более высокую активность антитела 4D11 (фиг. 3Б и 4) при оценке с использованием нескольких доноров. При оценке агонистической активности антител в отсутствии CD40L установлено, что антитело В, антитело А и антитело С не индуцировали никакой В-клеточной пролиферации, превышающей фоновые уровни при применении в концентрациях вплоть до 10 мкг/мл (67 нМ) (см. фиг. 4), аналогично антителу 4D11.

Вероятно, антитело-конкурент 4D11 является несколько более активным, что характеризуется средними значениями IC_{50} , составляющим ~0,02 нМ, и отсутствием агонистических действий. Данные для трех ВI-антител и антитела 4D11 обобщены на фиг. 4 и в табл. 2.2, выше. В этом анализе исследовали также другое антитело-конкурент PG-102 (полученное из клона 5D12), и у него обнаружили выраженное агонистическое действие, приводящее к стимуляции В-клеточной пролиферации в отсутствии CD40L (фиг. 4). Таким образом, отсутствие агонистической активности наиболее перспективных антител-кандидатов, предлагаемых в настоящем изобретении, резко отличает их от антитела PG-102.

Во втором анализе оценивали способность антител ингибировать повышающую регуляцию CD86 в человеческих В-клетках. При этом анализ осуществляли с использованием человеческой цельной крови или очищенных В-клеток в обоих случаях в присутствии экзогенного CD40L. В соответствии с данными, полученными при анализе В-клеточной пролиферации, у антитела В, антитела А и антитела С при оценке с использованием человеческой цельной крови обнаружена способность ингибировать опосредуемую CD40 повышающую регуляцию CD86 по данным, полученным с помощью проточной цитометрии (см. фиг. 5). В этом анализе установлено, что антитело С обладало активностью, сходной с активностью 4D11, а антитело В и антитело А обладали несколько более слабой активностью. Сравнение антитела В и 4D11 с использованием очищенных В-клеток или цельной крови продемонстрировало, что активность антитела В (значения IC_{50} и IC_{90}) практически не изменялась при использовании очищенных В-клеток по сравнению с В-клетками в присутствии других несущих CD40 клеток или сыворотки, в то время как для 4D11 обнаружено резкое изменение активности при использовании цельной крови (см. фиг. 6).

Аналогичные данные получены при оценке способности антитела В, антитела А и антитела С ингибировать повышающую регуляцию CD86 при использовании В-клеток обезьяны циномогус, при применении для анализа образцов цельной крови (см. фиг. 7). Антитело В, антитело А и антитело С при оценке с использованием крови обезьяны циномогус продемонстрировали способность ингибировать опосредуемую CD40 повышающую регуляцию CD86 при оценке с помощью проточной цитометрии. Таким образом, все эти антитела обладали функциональной перекрестной реактивностью в отношении CD40 обезьяны циномогус, сходную с активностью в отношении человеческого CD40.

Оценивали активность антитела В IgG1KOb и антитела В IgG1WT по способности опосредовать антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (фиг. 13). При осуществлении этого анализа клетки линии RAMOS инкубировали с человеческими PBMC, используя соотношение клеток-эффекторов и клеток-мишеней 50:1. Антитело В IgG1KOb и антитело В IgG1WT титровали, начиная с концентрации 20 мкг/мл, и уровень гибели клеток определяли по высвобождению LDH. Представлены данные, полученные в одном репрезентативном эксперименте. Данные продемонстрировали, что антитело В IgG1Wt 20E2-12-RlgG1WT является эффективным медиатором ADCC и что антитело В IgG1Kob, содержащее мутации, приводящие к элиминированию эффекторной функции, не обладало ADCC-активностью.

Пример 3. Исследование фармакокинетических/фармакодинамических характеристик.

А. Однократное IV-введение антитела А и антитела В в дозе 1 или 10 мг/кг обезьянам циномогус.

Антитело А и антитело В каждое в дозе 1 и 10 мг/кг вводили IV-путем самцам обезьян циномогус (N=3/дозу). Образцы крови собирали в течение 0-504 ч (3 недели), выделяли сыворотку и образцы хранили при -20°C до анализа. Образцы анализировали с помощью описанного выше сэндвич-ELISA. Профили зависимости концентрации в сыворотке от времени для обоих антител в организме обезьян после IV-введения обеих доз и фармакокинетические параметры обобщены на фиг. 8 и в табл. 2.7.1 (антитело А) и 2.7.2 (антитело В), представленных ниже. Для обоих антител обнаружена зависимость фармакокинетических характеристик от дозы, это позволяет предположить, что при применении низкой дозы клиренс главным образом зависит от опосредуемой мишенью элиминации, а при применении более высокой дозы клиренс антитела преимущественно связан с катаболизмом. Аналогичные зависящие от дозы фармакокинетические профили обнаружены для других МАТ, направленных против ассоциированных с мембраной мишеней (например, CD19, CD20, EGFR, CD146 и HER2). Клиренс антитела А составлял 0,8 и 0,1 мл/ч/кг для доз 1 и 10 мг/кг соответственно. Клиренс для антитела В составлял 0,7 и 0,1 мл/ч/кг для

доз 1 и 10 мг/кг соответственно. Аналогично этому время полужизни антитела А составляло 1 и 13 дней для доз 1 и 10 мг/кг соответственно, а для антитела В время полужизни составляло 2 и 13 дней для таких же доз соответственно. Хотя для антитела В было характерно несколько большее время полужизни при его применении в более низкой дозе по сравнению с применением антитела А в такой же дозе, вероятно, это различие не приведет к более длительной экспозиции при хроническом применении. Величина AUC для обоих соединений оказалась сверхпропорциональной и объем распределения (V_{ss}) для обоих соединений приблизительно соответствовал объему плазмы (~40 мл/кг), что характерно для ограниченного распределения в ткани, как правило, присущего крупным полярным белковым терапевтическим средствам. В целом, для двух антител не обнаружено существенных различий в фармакокинетических параметрах.

Таблица 2.7.1. Фармакокинетические параметры антитела А в организме самцов обезьян циномоглус (N=3)/дозу после однократного IV-введения в дозах 1 и 10 мг/кг

Доза (мг/кг)	CL _p (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	AUC (мкМ·ч)	T _{1/2} (дни)	MRT (дни)
1	0,8 ± 0,03	41 ± 6	8,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2
10	0,10 ± 0,02	42 ± 6	660 ± 92	12,6 ± 0,5	17,5 ± 0,3

Таблица 2.7.2. Фармакокинетические параметры антитела В в организме самцов обезьян циномоглус (N=3)/дозу после однократного IV-введения в дозах 1 и 10 мг/кг

Доза (мг/кг)	CL _p (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	AUC (мкМ·ч)	T _{1/2} (дни)	MRT (дни)
1	0,7 ± 0,16	40 ± 2	10,1 ± 2,7	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,8
10	0,09 ± 0,01	41 ± 6	744 ± 55	13,3 ± 3,0	19,3 ± 4,2

Б. Исследование фармакодинамических характеристик *ex vivo*.

В качестве части описанного выше ФК-исследования при создании изобретения анализировали фармакодинамические воздействия антител к CD40. Для этой цели образцы цельной крови инкубировали с рекомбинантным CD40L в течение ночи и оценивали повышение экспрессии CD86 на В-клетках с помощью проточной цитометрии. Образцы анализировали в день 0 (до обработки), через 2, 7 и 14 дней после введения доз. Хотя повышение экспрессии CD86 оказалось относительно небольшим (~5-20%), обнаружено зависящее от дозы действие (см. фиг. 9). В группе животных, которым вводили в дозе 10 мг/кг антитело А и антитело В, индукция CD86 полностью ингибировалась в дни 2, 7 и 14, что согласуется с постоянной экспозицией при применении этой дозы. У животных, обработанных дозой 1 мг/кг, обнаружено полное ингибирование в день 2, частичное ингибирование в день 7 и отсутствие ингибирования в день 14. Снижение с течением времени фармакодинамического действия коррелирует с более быстрым клиренсом антитела в группе, обработанной низкой дозой.

Пример 4. Исследования сопутствующих токсикологических действий: CD40 на тромбоцитах.

CD40 конститутивно экспрессируется на человеческих тромбоцитах (Henn и др., 2001) и (Inwald и др., 2003), при этом имеет место быстрая и кратковременная экспрессия CD40L на клеточной поверхности активированных тромбоцитов (Henn и др., 2001). Хотя предполагается, что антитела к CD40, не обладающие способностью к FcγR-связыванию, не должны оказывать воздействие на тромбоциты, важно непосредственно продемонстрировать, что это имеет место в данном случае. Опыты с использованием проточной цитометрии осуществляли для демонстрации связывания наиболее перспективных кандидатов-антител к CD40 с тромбоцитами человека и обезьян циномоглус.

Ранее было установлено с помощью проточной цитометрии, что G28.5 и МАт 89 к CD40 связываются с покоящимися тромбоцитами (Henn и др., 2001). Это было подтверждено с использованием меченого с помощью ФИТЦ антитела G28.5. Приготавливали 5-кратные серийные разведения G28.5 с концентрациями от 0,5 мкг/мл до 0,32 нг/мл, инкубировали с 100 мкл тромбоцитов, полученных из человеческой крови (2 донора) или крови обезьян циномоглус (3 донора), в течение 30 мин при комнатной температуре. Кроме того, меченное с помощью APC антитело к CD45 применяли для идентификации тромбоцитов, связанных с другими типами CD40 -клеток, для исключения указанных клеток из анализа. После окрашивания антителом тромбоциты промывали и фиксировали с помощью реагента Optilyse C и осуществляли проточную цитометрию. Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в качестве меры связывания антитела с CD45-тромбоцитами.

Поступающее в продажу антитело 5с3 и отобранные мышиные МАт к CD40 метили с помощью ФИТЦ. Определяли связывание с клетками линии Ramos. Количество молекул ФИТЦ на молекулу антитела составляло от 2 до 4 молекул ФИТЦ на молекулу антитела. Приготавливали пятикратные серийные разведения поступающего в продажу и перспективных МАт (кандидатов) к CD40 с концентрациями от 0,5 мкг/мл до 0,32 нг/мл и инкубировали с человеческими тромбоцитами (3 донора) и тромбоцитами из крови обезьяны циномоглус (2 донора) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Репрезентативный график, характеризующий связывание мышиного перспективного МАт к CD40 с

человеческими тромбоцитами, приведен на фиг. 11. Четыре моноклональных антитела-кандидата, отличающихся специфическим связыванием с человеческими тромбоцитами, сравнивали с меченным с помощью ФИТЦ применяемым в качестве контроля изотипа антителом. Для 10F2, 2H11, 19B10 и 20E2 обнаружено сопоставимое связывание с тромбоцитами. Аналогичная тенденция обнаружена для тромбоцитов обезьян циномолгус (данные не представлены).

Помимо указанных исследований осуществляли сравнение способности непосредственно меченных антитела В и 4D11 связываться с тромбоцитами и В-клетками в образцах цельной крови человека и обезьяны циномолгус (см. фиг. 12). Для 4D11 обнаружена сходная способность к связыванию (при оценке, например, по значениям EC_{50}) как с В-клетками, так и с тромбоцитами в образцах крови человека и обезьяны циномолгус. Для антитела В обнаружено аналогичное по схеме, но существенно более слабое по активности связывание.

Пример 5. Исследования фармакологических характеристик *in vivo* на мышинной NSG-модели.

Эффективность гуманизированных антител, а именно антитела А, оценивали с использованием модели получения антител, при применении которой человеческие PBMC инъецировали имеющим иммунодефицит NSG-мышам для получения реакции "трансплантат-против-хозяина". Заметное производство человеческих IgM (hIgM) и IgG (hIgG) удалось обнаружить, начиная с 2 недели после приживления трансплантата. Обработка антителом А в дозе 5 и 1 мг/кг приводила к значительному ингибированию hIgG- и hIgM-ответа через 2 и 3 недели после приживления трансплантата. Антитело-конкурент (4D11) исследовали в одной дозе 5 мг/кг и при этом обнаружено также аннулирование ответа. Во втором опыте исследовали все антитела, т.е. антитело А, антитело В и антитело С, в одной дозе 1 мг/кг, и при этом обнаружено полное ингибирование IgM- и IgG-ответа на второй неделе (фиг. 10).

Пример 6. Биомаркерный анализ.

Повышающая регуляция рецептора. Индуцированную CD40L повышающую регуляцию рецепторов можно оценивать с помощью проточной цитометрии. Человеческую цельную кровь можно стимулировать с помощью взятого в оптимизированной концентрации растворимого CD40L и общий процент комплекса CD20+рецептор+клетки можно определять с помощью проточной цитометрии. Изменение процента экспрессии CD86 на CD20-позитивных клетках можно оценивать параллельно с ФК-исследованиями на обезьянах циномолгус по изучению антител А и В (фиг. 9). Полученные данные свидетельствуют об ингибировании повышающей регуляции CD86 в моменты времени, соответствующие экспозиции антител.

Целевая протеомика. Повышенную секрецию белков при стимуляции CD40 в цельной крови можно применять в качестве потенциального(ых) биомаркера(ов). Оптимизированную концентрацию растворимого CD40L и продолжительность стимуляции определяли с использованием мультиплексной платформы гранул Luminex, позволяющей выявлять MDC/CCL22 и несколько других секретлируемых белков. Клинические образцы следует оценивать с использованием человеческой цельной крови во всем диапазоне доз МАт к CD40.

Оккупация рецептора. Оккупацию CD40-рецептора можно определять с помощью анализов *in vitro* или *ex vivo* на основе проточной цитометрии с использованием В-клеток из человеческой цельной крови. В анализе оккупации рецептора можно применять предлагаемые в настоящем изобретении антитела-кандидаты и неконкурирующее антитело к CD40 5C3.

Пример 7. Противоопухолевая активность гуманизированного антитела к CD40.

В некоторых случаях может требоваться определение противоопухолевых свойств антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Указанное определение можно осуществлять путем анализа противоопухолевой активности гуманизированного антитела к CD40 на модели ксенотрансплантата лимфомы, созданной на SCID-мышам. Применяемым для создания модели SCID-мышам можно инъецировать раковые клетки для получения опухоли, например, 5×10^6 млн опухолевых клеток можно вводить подкожно SCID-мышам (10 особей/группу) за 13 дней до начала обработки лекарственным средством. Мышинные антитела к CD40, предлагаемые в настоящем изобретении, или применяемый для сравнения вариант (например, контроль или другое гуманизированное антитело) вводили внутривенно 3 раза в неделю (4 мг/кг/дозу), осуществляя введение 8 или 5 доз. Мониторинг развития и роста опухолей у мышей и объем опухолей можно оценивать еженедельно в течение выбранного периода исследования, например, 14-дневного исследования. Предпочтительно результаты должны свидетельствовать о 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-кратном или более увеличении роста опухолей у контрольных мышей по сравнению с мышами, обработанными антителами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Предпочтительно в течение периода обработки рост опухолей у мышей, обработанных антителами, предлагаемыми в изобретении, должен быть незначительным. Указанные данные могут подтверждать, что тестируемое гуманизированное антитело обладает эффективностью в отношении подавления роста опухолей на модели ксенотрансплантата В-клеточной лимфомы.

Пример 8. Пролонгированная выживаемость при использовании гуманизированного антитела к CD40.

Эффективность гуманизированного антитела к CD40, приводящую к выживанию несущих опухоли мышей, например описанных выше, можно оценивать на модели ксенотрансплантата лимфомы, создан-

ной на SCID-мышам. SCID-мышам (10 особей/группу) инокулировали внутривенно 1×10^6 млн опухолевых клеток за три дня до обработки антителом. Затем мышей обрабатывали мышинными или гуманизированными антителами к CD40, предлагаемыми в настоящем изобретении, или Ig-контролем, осуществляя внутрибрюшинное введение дважды в неделю (4 мг/кг/дозу) в целом 5 доз. Затем ежедневно определяли смертность в клетках с мышами, оценивая уровень эффективности антител, проявляющейся в более длительном выживании имеющих рак индивидуумов.

В настоящем описании процитированы различные ссылки, включая заявки на патент, патенты и научные публикации, описание которых полностью включено в качестве ссылки. Цитирование или упоминание любой ссылки в настоящем описании не должно рассматриваться как признание того, что указанную ссылку следует рассматривать в качестве прототипа настоящего изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Бёрингер Ингельхайм Интернациональ ГмбХ

<120> Антитела к CD40

<130> 02950-22687US01

<160> 78

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность VH «лидерного» мышинового антитела к CD40 2H11

<400> 1

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

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

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

Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность VH «лидерного» мышиногo антитела к CD40 10F2

 <400> 2

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность VH «лидерного» мышиногo антитела к CD40 19B10

 <400> 3

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность VH «лидерного» мышиного антитела к CD40 20E2

<400> 4

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность VK «лидерного» мышиногo антитела к CD40 2H11

 <400> 5

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 6
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность VK «лидерного» мышиногo антитела к CD40 10F2

 <400> 6

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

Glu Lys Val Ile Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ala Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность VK «лидерного» мышиногo антитела к CD40 19B10

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность VK «лидерного» мышиногo антитела к CD40 20E2

<400> 8

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 His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Asn Leu 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> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи 2H11 и 19B10

<400> 9

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Val His
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи 10F2

<400> 10

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи 20E2

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи 2H11

<400> 12

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln
1				5				10						15	

Gly

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи 10F2

<400> 13

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

Gly

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи 19B10

<400> 14

Arg	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Asp	Thr	Lys	Phe	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln
1				5				10						15	

Gly

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2 тяжелой цепи 20E2

<400> 15

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

Gly

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR3 тяжелой цепи 2H11, 10F2 и 19B10

<400> 16

Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr
1				5				

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR3 тяжелой цепи 20E2

<400> 17

Gln	Asp	Gly	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи 2H11

<400> 18

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Leu
1				5					10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи 10F2

<400> 19

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile Leu
 1 5 10

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи 19B10

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Leu
 1 5 10

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи 20E2

<400> 21

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

Thr

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR2 легкой цепи 2H11, 10F2 и 19B10

<400> 22

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи 20E2

<400> 23

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи 2H11, 10F2 и 19B10

<400> 24

Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи 20E2

<400> 25

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26

<211> 220

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь антитела A

<400> 26

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

Glu Arg Ala 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 His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

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> 27

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0-формата антитела A

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 28

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1-изотипа антитела А

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 29

<211> 446

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG4DM-формата антитела A

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

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

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

<210> 30

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0b-формата антитела A

<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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210>	31
<211>	220
<212>	PRT
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь антитела В

<400> 31

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

Glu Lys Val 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 His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro 50 Pro 50 Lys 50 Leu 50 Leu 50 Ile 55 Tyr 55 Trp 55 Thr 55 Ser 60 Thr 60 Arg 60 Glu 60 Ser 60 Gly 60 Val 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

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> 32

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0-формата антитела В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 33

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1-изотипа антитела В

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

031872

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 34

<211> 446

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG4DM-формата антитела В

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

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

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

<210> 35

<211> 449

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0b-формата антитела В

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210>	36
<211>	213
<212>	PRT
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь антитела С

<400> 36

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0-формата антитела C

<400> 37

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe

031872

50						55										60
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		115						120				125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1-изотипа антитела С

<400> 38

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

031872

65					70						75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		115					120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 445

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG4DM-форматат антитела C

<400> 39

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

031872

				85					90					95			
Thr	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
		115					120					125					
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
	130					135					140						
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145				150						155					160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170					175			
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
			180					185					190				
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser		
	195						200					205					
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys		
	210					215					220						
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu		
225					230				235						240		
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu		
				245					250					255			
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln		
			260					265					270				
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		
	275						280					285					
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu		
	290					295					300						
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys		
305					310					315					320		
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys		
				325					330					335			

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

<210> 40

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь IgG1K0b-форматат антитела C

<400> 40

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

031872

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
	165	170
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
	180	185
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
	195	200
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
	210	215
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
	225	230
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	245	250
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	260	265
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	275	280
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	290	295
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	305	310
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	325	330
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	340	345
		350

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655034, так и BI 655035

<400> 41

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

Glu Arg 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 His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 42
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655034, так и BI 655035

 <400> 42

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655036, так и антитела А

 <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 Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655036, так и антитела A

<400> 44

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Ala Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 45
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655038, так и BI 655039
 <400> 45

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655038, так и BI 655039
 <400> 46

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655040, так и BI 655041

<400> 47

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655040, так и BI 655041
 <400> 48

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655042, так и BI 655043
 <400> 49

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655042, так и BI 655043

<400> 50

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655044, так и BI 655045

 <400> 51

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

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

Lys

<210> 52
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Вариабельная область легкой цепи как BI 655046, так и атителя В

 <400> 52

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

Glu Lys Val 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 His Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr 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 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи каждого из BI 655044, BI 655045, BI 655046 и антитела В

<400> 53

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область легкой цепи BI 655052

<400> 54

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область легкой цепи каждого из BI 655053, BI 655055, BI 655057, BI 655059 и BI 655061

<400> 55

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область легкой цепи каждого из BI 655054, антитела В,
 BI 655058, BI 655060 и BI 655062

<400> 56

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 57

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи каждого из BI 655052, BI 655053 и BI 655054

<400> 57

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655055, так и антитела С

<400> 58

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

031872

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655057, так и BI 655058

<400> 59

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655059, так и BI 655060

<400> 60

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариабельная область тяжелой цепи как BI 655061, так и BI 655062

<400> 61

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Ser Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

031872

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 1 из ан-
титела 19B10-Hum

<400> 62

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 2 из антитела 19B10-Hum

<400> 63

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 Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 3 из антитела 19B10-Hum

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe

50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 65
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 4 из ан-
 тигена 19B10-Hum
 <400> 65
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 66

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 5 из антитела 19B10-Hum

<400> 66

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Lys Phe Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 1 из антитела 10F2Hum

<400> 67

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 2 из антитела 10F2Hum

<400> 68

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 3 из антитела 10F2Hum

<400> 69

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

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

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

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

Gln Gly Lys Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 70
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 4 из антитела 10F2Hum

<400> 70

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 5 из ан-
 тигела 10F2Hum

<400> 71

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 118
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 6 из ан-
титела 10F2Hum

<400> 72

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 118
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи версии 7 из ан-
титела 10F2Hum

<400> 73

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74

<211> 106

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность вариabельной области легкой цепи версии 1 из ан-
 тигела 10F2Hum

<400> 74

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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 75
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность вариабельной области легкой цепи версии 2 из ан-
 тигела 10F2Hum

<400> 75

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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Phe Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

<210> 76
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность вариабельной области легкой цепи версии 3 из ан-
 тигела 10F2Hum

<400> 76

Gln 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 Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

Leu Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи 2H11, 10F2 и 19B10

<400> 77

Thr Thr Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Tyr Gly Tyr
1 5 10

```
<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи 20E2

<400> 78
```

Ala Arg Gln Asp Gly Tyr Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

1. Гуманизированное антитело к CD40, где антитело содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 17; и где антитело содержит последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 25.

3. Гуманизированное моноклональное антитело к CD40, которое имеет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 52 соответственно.

- 108 -

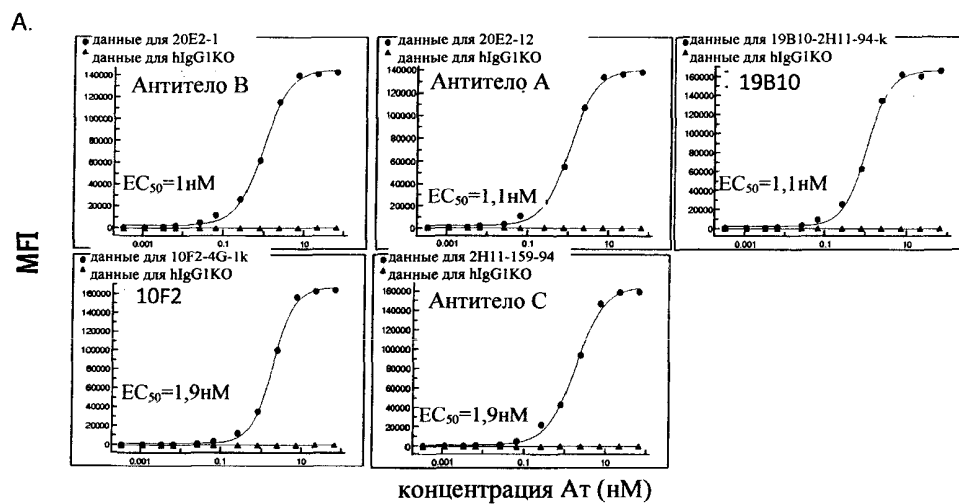
5. Применение по п.4, в котором аутоиммунное или воспалительное заболевание выбирают из группы, включающей ревматоидный артрит, рассеянный склероз, пролиферативный волчаночный гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), псориаз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), болезнь Крона и системную красную волчанку (SLE), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреотоксикоз/болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный кардит, болезнь Аддисона, преждевременную менопаузу, сахарный диабет типа 1, синдром Гудпасчера, тяжелую псевдопаралитическую миастению, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую лейкопению, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит (отрицательный по Ag HBs), криптогенный цирроз, синдром Шегрена, дерматомиозит, склеродерму, смешанную соединительнотканную болезнь, дискоидную красную волчанку и системный васкулит.

6. Применение комбинации антитела по пп.1, 2 или 3 со вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, включающей антагонист TNF, модифицирующее заболевание противоревматоидное средство, антагонист CTLA4, МАт к рецептору IL-6 и МАт к CD20, для лечения или облегчения заболевания или нарушения у млекопитающего, где заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей реакцию "трансплантат-против-хозяина", аутоиммунное или воспалительное заболевание и связанное с CD40 нарушение.

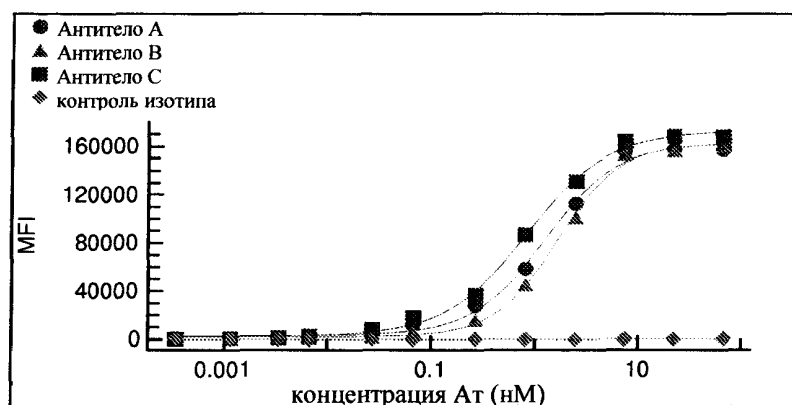
7. Фармацевтическая композиция для лечения или облегчения заболевания или нарушения у млекопитающего, где заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей реакцию "трансплантат-против-хозяина", аутоиммунное или воспалительное заболевание и связанное с CD40 нарушение, содержащая: (I) антитело по пп.1, 2 или 3 и (II) фармацевтически приемлемый эксципиент.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано/конъюгирован со вторым средством, где это второе средство является цитотоксическим агентом, ПЭГ-носителем, ферментом или маркером.

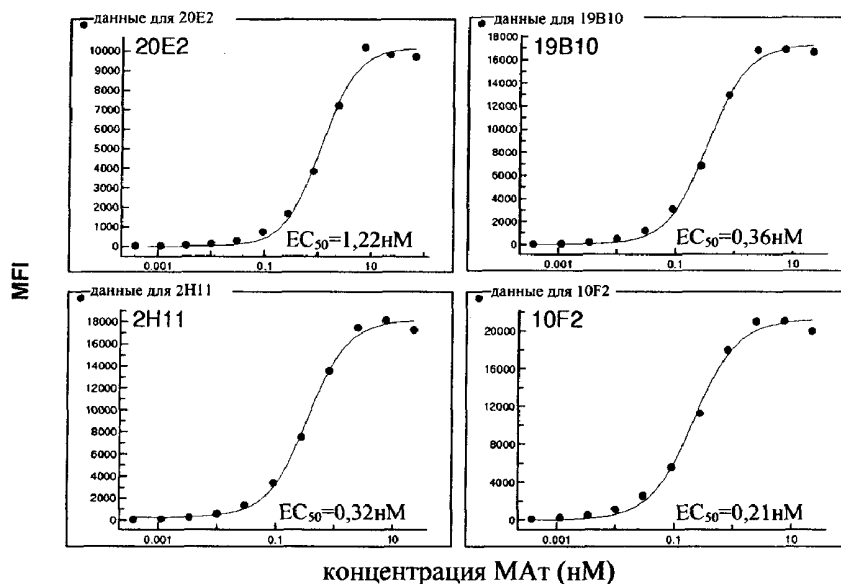
9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность тяжелой цепи или переменной области тяжелой цепи или аминокислотную последовательность легкой цепи и переменную область легкой цепи по пп.2 и/или 3, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 35, а аминокислотная последовательность легкой цепи содержит SEQ ID NO: 31 или аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, а аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи содержит SEQ ID NO: 52.



Б

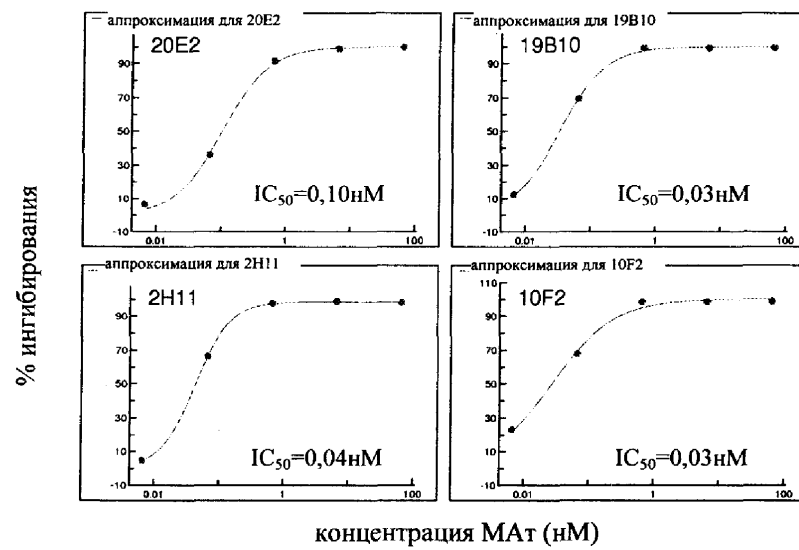


Фиг. 1

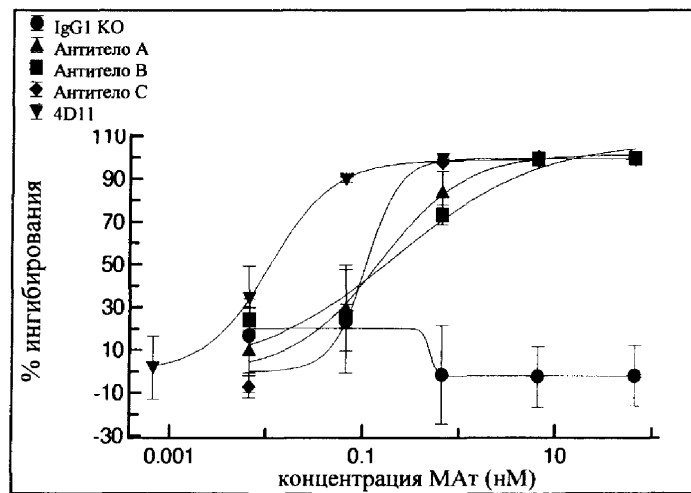


Фиг. 2

А.



Б.

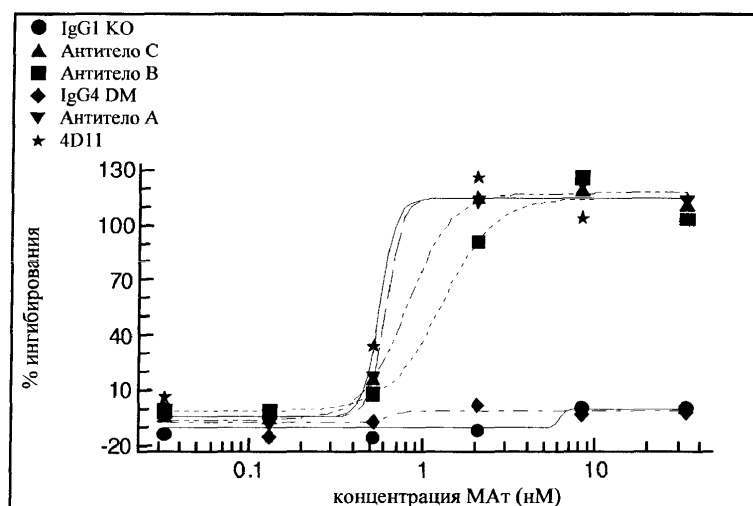


Фиг. 3

Анализ пролиферации человеческих В-клеток			
Название антитела	Изотип	Антагонизм	Агонизм
		средн. IC_{50} (нМ) $\pm$ С.К.О. (n)	$SI \pm$ С.К.О. (n)
Антитело В	hIgG1KO	$0,2 \pm 0,09$ (n=3)	$1 \pm 0,3$ (n=3)
Антитело А	hIgG1KO	$0,3 \pm 0,03$ (n=3)	$1 \pm 0,13$ (n=3)
Антитело С	hIgG1KO	$0,1 \pm 0,01$ (n=3)	$1 \pm 0,06$ (n=3)
10F2	hIgG1KO	$0,8 \pm 0,11$ (n=3)	$1 \pm 0,09$ (n=3)
4D11	hIgG4DM	$0,02 \pm 0,01$ (n=3)	$1 \pm 0,11$ (n=3)
G28.5	mIgG1	н.т.	$7 \pm 1,94$ (n=3)
mu5D12	hIgG4Pro	ингибирование отсутствует при использовании концентраций вплоть до 67нМ	$18 \pm 3,1$ (n=3)

н.т. – не тестировали

Фиг. 4

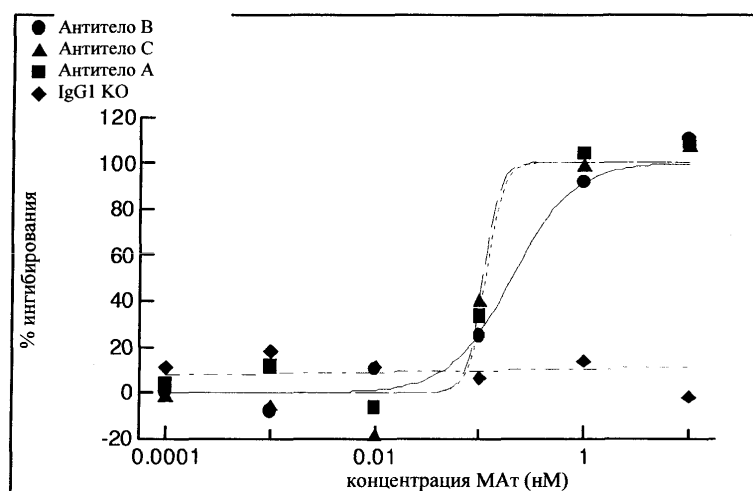


Фиг. 5

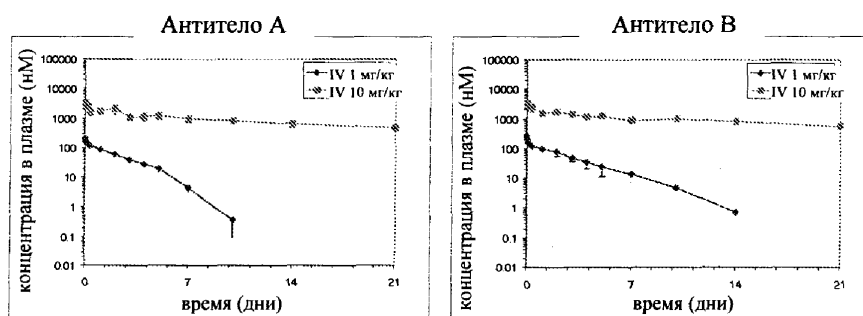
А.	МАт (изотип)	IC_{50} (нМ) $\pm$ С.К.О.		Кратность изменения
		Очищенные В-клетки	HWB	
	Антитело В	$0,6 \pm 0,3$ (n=4)	$1,3 \pm 0,7$ (n=4)	2,2
	4D11 (hIgG4 DM)	$0,03 \pm 0,01$ (n=5)	$0,6 \pm 0,3$ (n=4)	20,0

Б.	МАт (изотип)	IC_{90} (нМ) $\pm$ С.К.О.		Кратность изменения
		Очищенные В-клетки	HWB	
	Антитело В	$5,3 \pm 2,4$ (n=4)	$4,3 \pm 2,1$ (n=4)	0,8
	4D11 (hIgG4 DM)	$0,05 \pm 0,02$ (n=5)	$1,3 \pm 0,64$ (n=4)	26

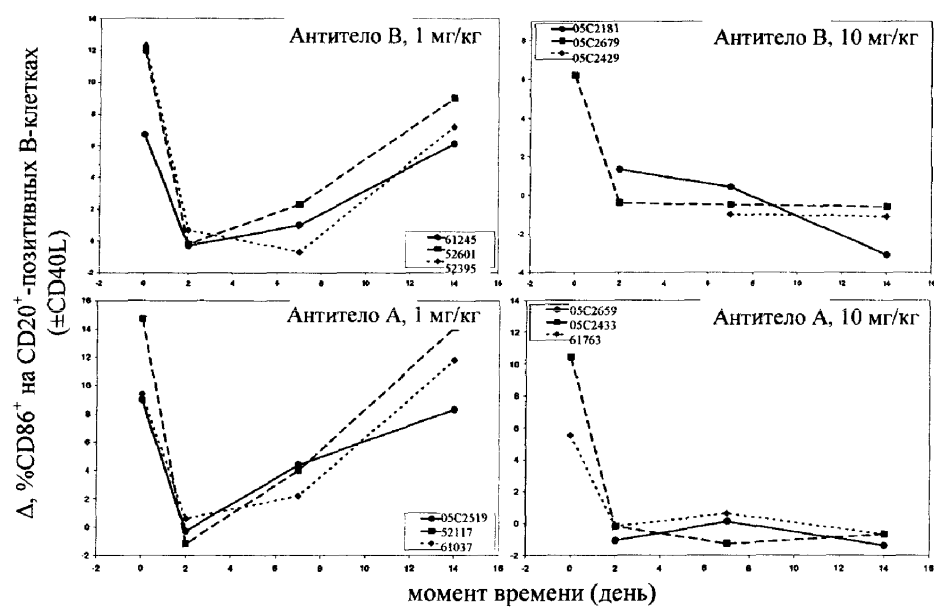
Фиг. 6



Фиг. 7

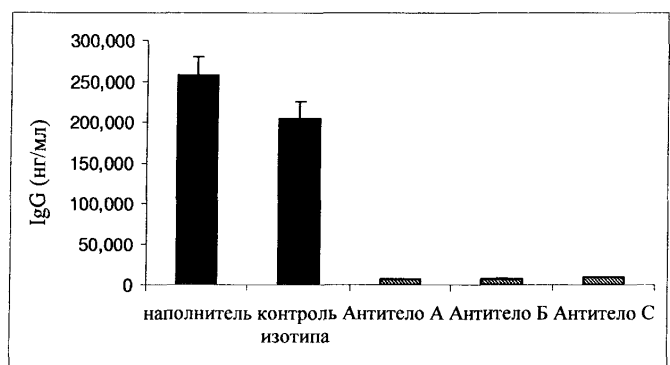


Фиг. 8

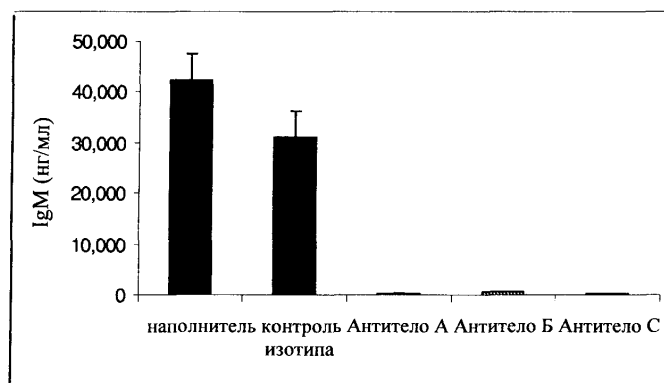


Фиг. 9

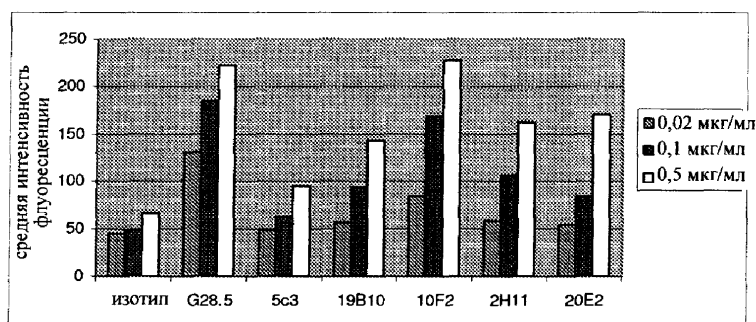
А.



Б.



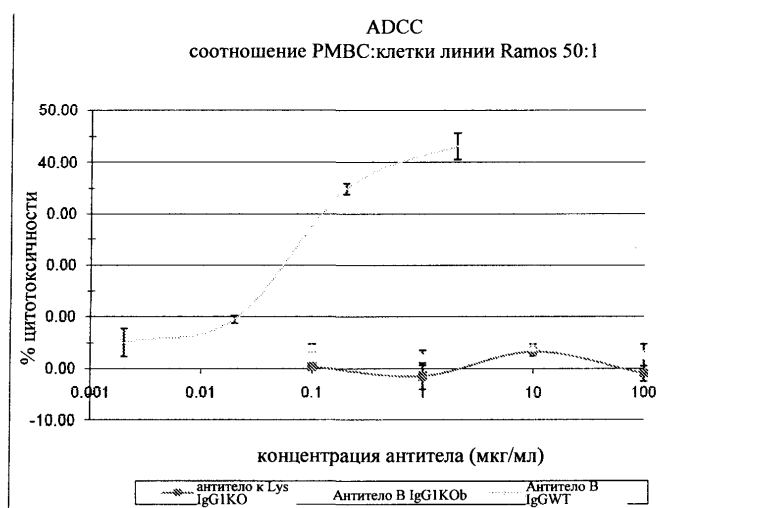
Фиг. 10



Фиг. 11

	EC ₅₀ , нМ (диапазон)	
	Антитело В	4D11
В-клетки		
человек (n=6)	1,8 (1,2-2,3)	0,3 (0,1-0,3)
обезьяна-циномолгус (n=5)	2,1 (1,4-2,9)	0,7 (0,6-0,8)
Тромбоциты		
человек (n=5)	4,6 (2,5-5,8)	0,7 (0,4-0,9)
обезьяна-циномолгус (n=5)	3,9 (2,7-6,2)	1,2 (0,9-1,7)

Фиг. 12



Фиг. 13

