

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290997** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

**(43)** Дата публикации заявки  
**2023.07.31**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.07.13**

**(51)** Int. Cl. *C07K 16/28* (2023.01)  
*A61K 39/395* (2023.01)  
*A61P 1/04* (2023.01)  
*A61P 1/16* (2023.01)  
*A61P 11/06* (2023.01)  
*A61P 15/00* (2023.01)  
*A61P 13/12* (2023.01)  
*A61P 7/00* (2023.01)  
*A61P 17/00* (2023.01)  
*A61P 19/00* (2023.01)  
*A61P 21/00* (2023.01)  
*A61P 25/00* (2023.01)  
*A61P 27/00* (2023.01)  
*A61P 29/00* (2023.01)  
*A61P 31/00* (2023.01)  
*A61P 3/10* (2023.01)  
*A61P 37/00* (2023.01)  
*A61P 5/00* (2023.01)

---

**(54)** **АНТИТЕЛО К CD154, ОБЛАДАЮЩЕЕ УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СВЯЗЫВАНИЯ, ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОТЕРАПИИ У ЧЕЛОВЕКА**

---

**(31)** 62/192,269; 62/197,966; 62/277,201

**(32)** 2015.07.14; 2015.07.28; 2016.01.11

**(33)** US

**(62)** 201890297; 2016.07.13

**(71)** Заявитель:  
**ИММЬЮНЕКСТ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ротстейн Джей (US), Холгейт Роберт  
Джордж Эдвард, Хирн Аррон (GB)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

**(57)** В данном документе предусмотрены улучшенные антитела к CD154, которые обладают улучшенной терапевтической активностью, периодом полувыведения *in vivo* и устраненной способностью связывания FcR и/или связывания/активации системы комплемента. В данном документе раскрыто применение этих антител для индукции толерантности и лечения иммунных заболеваний, в том числе аутоиммунных реакций, воспаления, отторжения трансплантата у реципиентов, фиброза и аллергических нарушений.

**A1**

**202290997**

**202290997**

**A1**

**АНТИТЕЛО К CD154, ОБЛАДАЮЩЕЕ УЛУЧШЕННЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ  
СВЯЗЫВАНИЯ, ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В  
ИММУНОТЕРАПИИ У ЧЕЛОВЕКА**

**1. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**Родственные заявки**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по каждой из предварительной заявки на патент США с регистрационным № 62/192269, поданной 14 июля 2015 года; предварительной заявки на патент США с регистрационным № 62/197966, поданной 28 июля 2015 года; и предварительной заявки на патент США с регистрационным № 62/277201, поданной 11 января 2016 года. Содержание каждой из этих предварительных заявок включено посредством ссылки во всей своей полноте.

**Область техники, к которой относится изобретение**

[0002] Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам к CD154 (CD154), обладающим сниженной токсичностью и функциональными свойствами, и их применению в схемах иммунотерапии, в особенности в лечении воспалительных нарушений, аллергии, аутоиммунных реакций, отторжения трансплантата и видов рака. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены высокоаффинные антитела к CD154 с улучшенной аффинностью и функциональной активностью, которые не вызывают тромбообразование или реакции свертывания *in vivo*, а которые вызывают требуемые терапевтические свойства, такие как индукция иммунотолерантности и блокирование гуморального иммунитета.

**Область техники, к которой относится изобретение**

[0003] Настоящее изобретение относится к улучшенным антителам к CD154 (CD154), обладающим сниженной токсичностью и функциональными свойствами, и их применению в схемах иммунотерапии, в особенности в лечении воспалительных нарушений, аллергии, аутоиммунных реакций, отторжения трансплантата и видов рака. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены высокоаффинные антитела к CD154 с улучшенной аффинностью и функциональной активностью, которые не вызывают тромбообразование или реакции свертывания *in vivo*, а которые

вызывают требуемые терапевтические свойства, такие как индукция иммунотолерантности и блокирование гуморального иммунитета.

#### Описание предшествующего уровня техники

[0004] CD40L (CD154) является весьма обоснованной и значимой терапевтической мишенью при аутоиммунных реакциях, отторжении трансплантата и других связанных с иммунитетом заболеваниях у мышей, отличных от человека приматов (NHP) и людей. Во многих клинических испытаниях II фазы было показано, что  $\alpha$ CD154 эффективно блокирует активности CD154 *in vivo* и облегчает заболевание.  $\alpha$ CD154 отличается от всех остальных терапевтических средств своим влиянием на иммунный ответ; при этом оно является одним из нескольких терапевтических средств, которые могут индуцировать функциональную иммунологическую толерантность, как продемонстрировано как на мышах, так и на обезьянах. На мышах, фактически все модели аутоиммунных заболеваний могут быть эффективно облегчены с помощью терапии  $\alpha$ CD154 (Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. and Burns, C., "CD40 and its ligand in autoimmunity". *Ann N Y Acad Sci* 1997. 815: 384-391; Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. and Noelle, R. J., "The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells", *J Leukoc Biol* 1998. 63: 418-428; Noelle, R. J., "CD40 and its ligand in cell-mediated immunity". *Agents Actions Suppl* 1998. 49: 17-22; и Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. and Noelle, R. J., "CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity". *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 307-328), при этом наблюдается долгосрочная ремиссия.

[0005] На NHP, устойчивая толерантность к аллотрансплантату может быть достигнута с помощью краткосрочных курсов приема средств для лечения, состоящих из  $\alpha$ CD154 (Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. and Ricordi, C., "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154". *Proc Natl Acad Sci., USA* 1999. 96: 8132-8137; Kirk, A.

D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D. K., TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. and Harlan, D. M., "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates". *Nat Med* 1999. 5: 686-693).

[0006] Также клинические испытания II фазы с участием людей показали, что  $\alpha$ CD154 является эффективным при SLE (Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397), рассеянном склерозе (см. предварительные данные) и идиопатической тромбоцитопении (Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397). В силу этого  $\alpha$ CD154 представляет собой уникальное лекарственное средство, которое обеспечивает краткосрочность процедуры вмешательства и долгосрочный клинический результат. Его недостатки заключались не в эффективности, а в непредвиденной токсичности.

[0007] В начале 1990-х IDEC Pharmaceuticals и Biogen Inc. (теперь Biogen Idec) запустили многофазные I/II клинические испытания двух разных mAb  $\alpha$ CD154. Антитело, разработанное IDEC (IDEC-131), представляло собой гуманизированный IgG1, полученный из мышинового антитела к CD154 человека, разработанного в Дартмутском колледже. Это антитело и гуманизированные варианты раскрыты в патентах США №№ 6001358; 6440418; 6506383; 7074406 и 7122187, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. Хотя предварительные оценки демонстрировали, что лекарственное средство было высокоэффективным, токсичность другого антитела к CD154 не позволяла продолжать клиническое исследование. В испытаниях наблюдаемая токсичность включала развитие тромбоэмболических осложнений у пациентов. С учетом вызывающих опасения проблем, связанных с токсичностью, все испытания были приостановлены и

усилия были направлены на переконструирование mAb с сохранением эффективности и снижением токсичности.

[0008] В то время как достигалась сниженная токсичность, наблюдалось существенное уменьшение эффективности и способности mAb  $\alpha$ CD154 к индукции толерантности (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594).

[0009] Biogen-Idex и UCB недавно сообщили о разработке антител к CD154 с улучшенной, согласно имеющимся сообщениям, безопасностью. Точнее говоря, они сообщили о получении пегилированного Fab к CD154 человека, названного CDP-7657 или руплизумаб. Поскольку Fab обычно характеризуются очень коротким периодом полувыведения *in vivo* (т. е. приблизительно 4-8 часов), у этого Fab должны были улучшиться его фармакокинетические свойства. Однако, несмотря на имеющиеся сообщения о клинической эффективности, это антитело, согласно имеющимся сообщениям, проявляет низкую специфическую активность. Кроме того, Bristol Meyers Squibb сообщила о разработке слитого белка на основе Fc-домена антитела, имеющего специфичность в отношении CD154. Согласно имеющимся сообщениям этот слитый белок показал эффективность в мышинных моделях заболеваний, в частности модели с иммунизацией KLN и модели SLE (волчанки) у NZB  $\times$  NZW.

[00010] Несмотря на вышеизложенное, в данной области техники все еще существует значительная потребность в улучшенных антителах к CD154, т. е. антителах, которые являются как безопасными, так и эффективными, и которые имеют хорошую специфическую активность и фармакокинетические свойства. Эти цели достигаются с помощью настоящего изобретения.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[00011] На **фигурах 1A-1C** представлены аминокислотные последовательности антитела к CD154 по настоящему изобретению,

которое было получено из IDEC-131. На фигуре остатки вариабельной области в полипептидах как тяжелой, так и легкой цепей выделены жирным шрифтом, CDR выделены желтым цветом, мутированные остатки, ответственные за созревание аффинности, подчеркнуты и мутации в Fc (E $\square$ R и K $\square$ A) выделены красным цветом и подчеркнуты.

[00012] На **фигурах 2A-2C** представлены результаты выравнивания разных модифицированных константных областей IgG1 и модифицированных последовательностей легкой и тяжелой цепей, полученных из IDEC-131, с их исходным мышинным антителом.

[00013] На **фигуре 3** представлены результаты анализов связывания на VIAcore со сравнением связывания гуманизированного антитела к CD154 человека (упоминаемого на **фигуре** и в настоящей заявке как "INX021") с IDEC-131 в отношении их способности к связыванию CD154, экспрессируемого на клетках Jurkat. Как показано, антитело по настоящему изобретению характеризуется приблизительно 5-кратным увеличением аффинности связывания с CD154 (экспрессируемого на клетках Jurkat) по сравнению с IDEC-131.

[00014] На **фигуре 4** представлены экспериментальные результаты, показывающие, что антитело по настоящему изобретению ("INX021") более эффективно управляет активацией В-клеток, управляемой CD154 Т-клетками, чем IDEC-131.

[00015] На **фигуре 5** представлены экспериментальные результаты, показывающие, что мутанты FcR человеческих IgG-антител к CD154 мыши, содержащие те же мутации, что и INX021 (K322A и E269R), индуцируют толерантность в модели толерантности кожи.

[00016] На **фигуре 6** представлены экспериментальные результаты, показывающие, что иммунные комплексы с INX201 не индуцируют агрегацию или активацию тромбоцитов мыши или человека *in vitro*.

[00017] На **фигурах 7A-7D** представлены экспериментальные результаты, показывающие, что INX021 не вызывает активацию тромбоцитов или другие эффекты, оказываемые на тромбоциты, по сравнению с антителом положительного контроля. На **фигуре 7A**

показано, что оно не вызывает нарушение функции тромбоцитов, на **фигуре 7B** показано, что оно не приводит к агрегации тромбоцитов или свертыванию, о чем свидетельствует отсутствие наблюдаемых эмболов в легких, на **фигуре 7C** показано, что оно не оказывает влияния на число циркулирующих тромбоцитов, и на **фигуре 7D** обобщены наблюдаемые преимущества этого антитела, наблюдаемые у трансгенных по Fc $\gamma$ RIIa мышей.

[00018] На **фигурах 8A и 8B** показано, что IgG1-антитела к CD154 мыши, содержащие мутации в Fc, которые снижают или устраняют связывание FcR и активность системы комплемента (мутации E2669R и K322A, содержащиеся в INX021), подавляют иммунный ответ в животных моделях. На **фигуре 8A** показано, что антитело к CD154, содержащее эти мутации, подавляет ЕАЕ, и на **фигуре 8B** показано, что антитело к CD154, содержащее эти мутации, подавляет гуморальный иммунитет и индуцирует толерантность в ответ на воздействие миелинового гликопротеина олигодендроцитов ("MOG").

[00019] На **фигуре 9** сравниваются эффекты разных вариантов антитела IDEC-131, в том числе INX021, на индуцируемую Т-клетками активацию В-клеток на основании экспрессии CD86. Их эффекты различаются, что указывает на то, что повышенная аффинность связывания необязательно коррелирует с лучшей специфической активностью, т. е. активностью подавления иммунного ответа.

[00020] На **фигурах 10A и 10B** сравниваются эффекты INX021 и химерного антитела 5c8 на продуцирование IgG- и IgM-антител в анализе КЛН. На **фигуре 10A** сравниваются их эффекты в отношении IgG, и на **фигуре 10B** сравниваются их эффекты в отношении IgM.

[00021] На **фигурах 11A и 11B** сравниваются эффекты среды-носителя, INX021 и антитела 5c8 на баллы оценки зародышевых центров. На **фигуре 11A** показано сравнение баллов оценки зародышевых центров, и на **фигуре 11B** представлены гистограммы, сравнивающие число зародышевых центров и степень их насыщенности клетками в селезенках и лимфатических узлах (LN) обработанных животных.

[00022] На **фигуре 12** кратко описана наблюдаемая частота возникновения очагов поражения по сравнению с опубликованными результатами по другому антителу к CD154 (пегилированному Fab  $\alpha$ CD154 от Biogen/UCB).

#### **ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[00023] Целью настоящего изобретения является обеспечение антитела к CD154, обладающего улучшенной эффективностью, безопасностью и фармакокинетикой, для применения в терапии у человека.

[00024] Более конкретно, целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека, которое содержит (i) полипептид переменной области тяжелой цепи, содержащий или состоящий из полипептида, имеющего последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, 17 и 18, показанных на **фигурах 2A-2C**, и (ii) полипептид переменной области легкой цепи, содержащий или состоящий из полипептида, имеющего последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и 31, показанных на **фигурах 2A-2C**, при условии, что гуманизованное антитело к CD154 человека не содержит полипептид переменной области тяжелой цепи с SEQ ID NO:15 и полипептид переменной области легкой цепи с SEQ ID NO:20.

[00025] Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека, которое содержит (i) полипептид переменной области тяжелой цепи, содержащий или состоящий из полипептида, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 1, показанную на **фигурах 1A-C**, и (ii) полипептид переменной области легкой цепи, содержащий или состоящий из полипептида, имеющего последовательность под SEQ ID NO: 2, показанную на **фигурах 1A-C**.

[00026] Также целью настоящего изобретения является обеспечение антитела к CD154 человека, изложенного в предыдущих 3 абзацах, которое содержит константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 с отсутствующей способностью к связыванию C1q и связыванию Fc $\gamma$ R2 и/или Fc $\gamma$ R3.

[00027] Также целью настоящего изобретения является обеспечение антитела к CD154 человека, изложенного в предыдущих 4 абзацах, которое содержит константные области IgG1 человека с отсутствующей способностью к связыванию C1Q и связыванию FcR $\gamma$ 2 и/или FcR $\gamma$ 3.

[00028] Также целью настоящего изобретения является обеспечение антитела к CD154 человека, изложенного в предыдущих 5 абзацах, содержащего константные области IgG1 человека, содержащие мутации E269R и K322A (нумерация в соответствии с Kabat).

[00029] Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, которое содержит константные области легкой и тяжелой цепей IgG1 с SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:2, показанными на **фигурах 1A-C**.

[00030] Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, где антитело принадлежит к изотипу IgG1, и Fc-область антитела дополнительно мутирована для введения по меньшей мере одной другой мутации, которая влияет на эффекторную функцию, такой как мутация, которая ухудшает связывание FcR $\eta$ , мутация, которая ухудшает или устраняет гликозилирование, или другая мутация, которая ухудшает способность антитела связываться с FcR, таким как Fc $\gamma$ R2, или Fc $\gamma$ R3, или другой FcR, или которая ухудшает связывание с системой комплемента.

[00031] Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, где антитело принадлежит к изотипу IgG1, и Fc-область антитела мутирована для дополнительного введения мутации E233P и/или D265A или любой из мутаций в Fc, идентифицированных в **таблице 1, 2 или 3**.

[00032] Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, где антитело

принадлежит к изотипу IgG1, и Fc-область антитела мутирована для введения мутации E233R.

**[00033]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, где Fc-область антитела дополнительно мутирована для введения одной или нескольких других мутаций, которые улучшают период полувыведения *in vivo*.

**[00034]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00035]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, которая дополнительно содержит антиген, клетку, ткань или орган.

**[00036]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гуманизованного антитела к CD154 человека в соответствии с любым из предыдущих абзацев, которая дополнительно содержит аутоантиген, аллерген, агент, вызывающий воспаление, лекарственное средство или несовместимую по HLA (аллогенную) или ксеногенную (отличную от человеческой) донорскую клетку.

**[00037]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа иммуносупрессии или иммунотерапии с применением антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00038]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения субъекта с аллергическим, воспалительным или аутоиммунным нарушением или реципиента

трансплантата путем введения антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00039]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения или предупреждения GVHD у субъекта путем введения антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев перед, во время или после трансплантации донорской ткани, органа или клеток, которые необязательно могут быть созданы методами генетической инженерии, например, CAR-T (Т-клетки с химерным антигенным рецептором) или NK-клетки (естественные киллеры).

**[00040]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа обеспечения толерантности или продолжительной антигенспецифической иммуносупрессии путем введения антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев, где способ необязательно дополнительно включает введение клетки, антигена, ткани или органа, содержащих антиген, в отношении которого вызывается толерантность или продолжительная иммуносупрессия.

**[00041]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа генной, клеточной, тканевой или органной терапии, который включает введение антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00042]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения состояния, выбранного из псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, оофорита, волчанки или SLE, диабета, IBD, болезни Крона, ITP, тиреоидита, ревматоидного артрита, тяжелой миастении, системной красной волчанки, болезни Грейвса, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, гемолитической анемии, сахарного диабета, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, рассеянного склероза, псориаза, лекарственных аутоиммунных заболеваний или лекарственной волчанки, путем введения антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00043]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа обработки костного мозга, органа или иммунных клеток, которые предназначены для применения в

клеточной терапии или трансплантации органа или костного мозга, включающего инкубацию указанных костного мозга, органа, ткани или иммунных клеток с антителом или композицией в соответствии с любым из предыдущих абзацев, например, где обработанные костный мозг, ткань, орган или иммунные клетки содержат Т-клетки донора и/или реципиента.

**[00044]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа индукции толерантности без возникновения тромботических осложнений у пациента, нуждающегося в этом, включающего введение пациенту эффективного количества антитела или в соответствии с любым из предыдущих абзацев, который необязательно дополнительно включает введение антигена, например, аутоантигена, аллергена, агента, вызывающего воспаление, лекарственного средства или несовместимой по НЛА (аллогенной) донорской клетки.

**[00045]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа индукции толерантности, продолжительного подавления иммунного ответа или Т- или В-клеточного ответа у пациента, которому должны трансплантировать клетки, орган или ткань или которому уже трансплантировали их, например, где лекарственное средство является биологическим, таким как терапевтическое антитело, рецептор, слитый белок, гормон, фактор роста или цитокин.

**[00046]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения опосредованного Т-клетками аутоиммунного нарушения путем введения эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00047]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения опосредованного В-клетками аутоиммунного нарушения путем введения эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00048]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения аутоиммунного заболевания, выбранного из ревматоидного артрита, тяжелой миастении,

системной красной волчанки, болезни Грейвса, болезни Гентингтона, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, гемолитической анемии, сахарного диабета, болезни Паркинсона, псориаза, болезни Аддисона, рассеянного склероза, волчанки и лекарственных аутоиммунных заболеваний, например, лекарственной волчанки, путем введения эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00049]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения в соответствии с любым из предыдущих абзацев, который включает введение антигена.

**[00050]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения или предупреждения GVHD, отторжения костномозгового трансплантата (ВМТ), рассеянного склероза, волчанки, ИТР, ревматоидного артрита, астмы, IBD или другого воспалительного заболевания кишечника путем введения эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев.

**[00051]** Также целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения состояния, нарушения или заболевания у человека, опосредованных в целом или частично передачей сигнала с участием CD40, или симптома любого из вышеуказанных, при этом способ включает введение эффективного количества антитела или композиции в соответствии с любым из предыдущих абзацев, например, где состояние, нарушение или заболевание у человека представляют собой воспалительный, аллергический или аутоиммунный ответ или фиброз, или состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из волчаночного нефрита, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, спондилоартрита, лекарственной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, псориаза и рассеянного склероза, или состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из аллергического контактного дерматита, генерализованной алопеции, геморрагической пурпуры, астмы, тяжелой астмы, метаболической астмы, аллергической астмы, атопического дерматита, герпетиформного дерматита, стойкой возвышающейся эритемы, кольцевидной эритемы, многоформной

эритемы; узловой эритемы, аллергического гранулематоза, кольцевидной гранулемы, гранулоцитопении, гиперчувствительного пневмонита, кератита, нефротического синдрома, перекрестного синдрома, аллергоза голубеводов, идиопатического полиневрита, крапивницы, увеита, ювенильного дерматомиозита и витилиго, или состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из аллергического бронхолегочного аспергиллеза; аутоиммунной гемолитической анемии; акантокератодермии; аллергического контактного дерматита; болезни Аддисона; атопического дерматита; гнездовой алопеции; генерализованной алопеции; амилоидоза; геморрагической пурпуры; анафилактоидной реакции; апластической анемии; врожденного ангионевротического отека; идиопатического ангионевротического отека; анкилозирующего спондилоартрита; височного артериита; гигантоклеточного артериита; артериита Такаясу; темпорального артериита; астмы; телеангиэктатической атаксии; аутоиммунного оофорита; аутоиммунного орхита; аутоиммунного полиэндокринного синдрома; болезни Бехчета; болезни Бергера; болезни Бюргера; буллезной пузырчатки; хронического кандидоза кожи и слизистых оболочек; синдрома Каплана; постинфарктного синдрома; посткардиотомного синдрома; кардита; целиакии-спру; болезни Шагаша; синдрома Чедиака-Хигаси; болезни Черджа-Стросса; синдрома Когана; болезни холодových агглютининов; CREST-синдрома; болезни Крона; криоглобулинемии; криптогенного фиброзирующего альвеолита; герпетиформного дерматита; дерматомиозита; сахарного диабета; синдрома Даймонда-Блекфена; синдрома Ди Джорджи; дискоидной красной волчанки; эозинофильного фасциита; эписклерита; стойкой возвышающейся эритемы; кольцевидной эритемы; многоформной эритемы; узловой эритемы; семейной средиземноморской лихорадки; синдрома Фелти; легочного фиброза; геморрагического гломерулонефрита; аутоиммунного гломерулонефрита; постстрептококкового гломерулонефрита; гломерулонефрита, развивающегося после трансплантации; мембранозного гломерулонефрита; синдрома Гудпасчера; реакции "трансплантат против хозяина"; иммуноопосредованной гранулоцитопении; кольцевидной гранулемы; аллергического гранулематоза; гранулематозного миозита; болезни

Грейвса; тиреоидита Хашимото; гемолитической болезни новорожденных; идиопатического гемохроматоза; пурпуры Геноха-Шенлейна; хронического активного и хронического прогрессирующего гепатита; гистиоцитоза х; гиперэозинофильного синдрома; идиопатической тромбоцитопенической пурпуры; синдрома Джоба; ювенильного дерматомиозита; ювенильного ревматоидного артрита (ювенильного хронического артрита); болезни Кавасаки; кератита; сухого кератоконъюнктивита; синдрома Ландри-Гийена-Барре-Штроля; лепроматозной проказы; синдрома Леффлера; синдрома Лайелла; болезни Лайма; лимфоматоидного гранулематоза; системного мастоцитоза; смешанного заболевания соединительной ткани; множественного мононеврита; синдрома Макла-Уэльса; слизисто-кожного лимфонодулярного синдрома; слизисто-кожного лимфонодулярного синдрома; многоочагового ретикулогистиоцитоза; рассеянного склероза; тяжелой миастении; грибовидного микоза; системного некротического васкулита; нефротического синдрома; перекрестного синдрома; панникулита; пароксизмальной холодовой гемоглобинурии; пароксизмальной ночной гемоглобинурии; пемфигоида; пузырчатки; эритематозной пузырчатки; листовидной пузырчатки; обыкновенной пузырчатки; аллергоза голубеводов; гиперчувствительного пневмонита; узелкового полиартериита; ревматической полимиалгии; полимиозита; идиопатического полиневрита; видов семейной полинейропатии португальского типа; преэклампсии/эклампсии; первичного биллиарного цирроза; прогрессирующего системного склероза (склеродермии); псориаза; псориатического артрита; легочного альвеолярного протеиноза; легочного фиброза, феномена/синдрома Рейно; тиреоидита Риделя; синдрома Рейтера, рецидивирующего полихондрита; острой ревматической лихорадки; ревматоидного артрита; саркоидоза; склерита; склерозирующего холангита; сывороточной болезни; синдрома Сезари; синдрома Шегрена; синдрома Стивенса-Джонсона; болезни Стилла; подострого склерозирующего панэнцефалита; симпатической офтальмии; системной красной волчанки; отторжения трансплантата; язвенного колита; недифференцированного заболевания соединительной ткани; хронической крапивницы;

холодовой крапивницы; увеита; витилиго; болезни Вебера-Кристиана; гранулематоза Вегенера и синдрома Вискотта-Олдрича.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[00052] Прежде чем раскрывать настоящее изобретение более подробно приводятся следующие определения. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

[00053] Термин "антитело", как он используется в данном документе в отношении настоящего изобретения, предусматривает выделенное, рекомбинантное или синтетическое антитело, конъюгат антитела или производное антитела. Зачастую предполагается, что термин "антитело" предусматривает фрагмент антитела, в том числе антигенсвязывающий фрагмент, если иное не указано или понятно из контекста. Антиген-связывающий фрагмент конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание. См. в целом *Fundamental Immunology*, гл. 7 (под ред. Paul, W., 2-е изд. Raven Press, N.Y. (1989)). Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты включают Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, Fd, Fv, доменные антитела (dAb), другие одновалентные и двухвалентные фрагменты, фрагменты, представляющие собой определяющую комплементарность область (CDR), одноцепочечные антитела (например, scFv, scFab и scFabδC), химерные антитела, диатела, триатела, мини-антитела, нанотела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть антитела, которой достаточно для придания полипептиду специфического связывания с антигеном; а также продукты слияния и производные вышеуказанных. См., например, Holliger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136 (2005) и Hust et al., *VMC Biotech* 7: 14 (2007).

[00054] Если не определено иное или в случае, если контекст подразумевает иное, "антитело" по настоящему изобретению

предусматривает целые антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты, производные или варианты антитела, которые могут содержать одну или несколько модификаций (например, вставку, делецию, замену аминокислоты, посттрансляционную модификацию или отсутствие таковой и т. д.), в том числе конъюгаты антитела (т. е., антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные или ассоциированные с функциональным компонентом). В основе производных антитела, в том числе конъюгатов антитела, может лежать антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, который специфически связывает CD154, или они могут содержать его. Кроме того, вышеупомянутые варианты осуществления антитела могут представлять собой антитела мыши, хомячка, козы, кролика, химерные, гуманизированные или полностью человеческие антитела, фрагменты, производные или конъюгаты. Следует понимать, что в определенных аспектах настоящего изобретения термин "антитело" может исключать один или несколько вариантов осуществления антитела, перечисленных выше; такие условия будут очевидны специалисту в данной области техники.

**[00055]** Термин "эффекторная функция" обозначает функциональную способность Fc или константной области антитела связывать белки и/или клетки иммунной системы. Антитела, обладающие сниженной эффекторной функцией, и способы конструирования таких антител хорошо известны из уровня техники (см., например, WO 05/18572, WO 05/03175 и патент США № 6242195) и описаны более подробно в данном документе. Типичные эффекторные функции включают способность связывать белок системы комплемента (например, белок C1q системы комплемента) и/или Fc-рецептор (FcR) (например, FcγRI, FcγRII, FcγRIIa, FcγRIII и/или FcγRIIIb). Функциональные последствия способности связывать одну или несколько из вышеуказанных молекул включают без ограничения опсонизацию, фагоцитоз, антигензависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), комплементзависимую цитотоксичность (CDC) и/или модулирование эффекторных клеток. Уменьшение эффекторной функции обозначает уменьшение одной или нескольких биохимических или клеточных видов активности, индуцированное по

меньшей мере частично за счет связывания Fc с его когнатным рецептором, или белком системы комплемента, или эффекторной клеткой, с одновременным поддержанием антигенсвязывающей активности вариабельной области антитела (или его фрагмента), несмотря на сниженную, аналогичную, идентичную или повышенную аффинность связывания. Конкретные антитела по настоящему изобретению характеризуются сниженной эффекторной функцией. Уменьшения эффекторной функции, например, связывания Fc с Fc-рецептором или белком системы комплемента, можно выразить в виде кратности снижения (например, снижена в 1,5 раза, 2 раза и т. п.) и можно рассчитать на основании, например, процентных значений снижения активности связывания, определенных с применением анализов связывания, известных из уровня техники (см., например, WO 05/18572).

**[00056]** Если контекстом не требуется иное, термины в единственном числе будут включать формы множественного числа, и термины во множественном числе будут включать форму единственного числа.

**[00057]** Во всем данном описании и формуле изобретения слово "содержать" или такие вариации, как "содержит" или "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

**[00058]** Термин "CD154" обозначает лиганд, который экспрессируется на активированных Т-клетках. CD154 известен в данной области техники под несколькими другими названиями, такими как лиганд CD40 (CD40L), контррецептор CD40 (CD40CR), gp39, T-BAВ, активирующая Т-клетки молекула, TRAF, родственник TNF активационный белок (TRAP) и представитель 5 суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNFSF5) (Gauchat et al., 1993 *FEBS Lett.* 315: 259-266; Graf et al. 1992, *Europ. J. Immun.* 22: 3191-3194; Hollenbaugh et al., 1992 *EMBO J.* 11: 4313-4321). Эти термины используются взаимозаменяемо во всей настоящей заявке. CD154-связывающие белки, в том числе антитела по настоящему изобретению, специфически связываются с CD154 человека и могут давать перекрестную реакцию, и, следовательно,

специфически связываться с CD154 от других видов. В определенных вариантах осуществления CD154-связывающие белки, в том числе антитела по настоящему изобретению, специфически связываются с CD154 человека, CD154 мыши или CD154 отличного от человека примата.

[00059] Термин "антитело к CD154" также охватывает синтетическое антитело или рекомбинантное антитело, которое получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом. Термин "антитело к CD154" также следует толковать как предусматривающий антитело, которое было получено с помощью синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и при этом молекула ДНК экспрессирует белок-антитело, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, где ДНК или аминокислотная последовательность были получены с помощью технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной из уровня техники.

[00060] Выражение "мутация или мутации, которые устраняют или снижают связывание FcR и которые устраняют токсичность" в данном документе обозначает мутацию или мутации, которые устраняют или снижают тромбоцитопению, или тромбоз, или свертывание *in vitro* и/или *in vivo*. Участки в Fc или константные области человеческих антител разных типов, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, которые могут быть модифицированы для устранения или снижения связывания FcR и оказания влияния (ослабления или усиления) на другие эффекторные функции Fc, хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные мутации, с помощью которых можно модифицировать Fc или константную область IgG1 человека, идентифицированы в таблицах 1-3 и в примерах ниже.

[00061] Выражение "мутация или мутации, которые устраняют или снижают функцию системы комплемента и которые поддерживают свойства индукции толерантности" обозначает мутацию или мутации в человеческих, химерных или гуманизированных антителах, содержащих константные области человека, предпочтительно константные области IgG1 или IgG3 человека, где их Fc-область

была мутирована в одном или нескольких участках с целью устранения или существенного снижения связывания системы комплемента. Предпочтительно такие мутации не будут заметно влиять на способность антитела индуцировать толерантность *in vivo*. Это можно установить с помощью соответствующих моделей толерантности, таких как модель трансплантации кожи. Участки в Fc или константные области человеческих антител разных типов, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, которые могут быть модифицированы для устранения или снижения связывания системы комплемента и которые могут оказывать влияние (ослаблять или усиливать) на другие эффекторные функции Fc, хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные участки, которые можно модифицировать в IgG1, идентифицированы в **таблицах 1-3** и примерах ниже.

[00062] Выражение "пациент" может означать человека либо отличного от человека животного, предпочтительно млекопитающего. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения получают антитела к CD154 человека, подходящие для терапии у человека, которые содержат мутированные константные области IgG1 или IgG3, где такие мутации устраняют или существенно сдерживают токсичность или проблемы безопасности, такие как тромбоцитопения, или тромбоз, или реакции свертывания, или токсичность, ассоциированную с реакциями системы комплемента, и при этом предпочтительно у таких антител сохраняется способность индуцировать толерантность или продолжительное подавление гуморального ответа *in vivo*.

[00063] Как используется в данном документе, "субъект" обозначает организм или образец клетки, образец ткани или образец органа, полученные от него, в том числе, например, культивируемые линии клеток, биоптат, образец крови или образец жидкости, содержащие клетку. Во многих случаях субъект или образец, полученный от него, содержат несколько типов клеток. В одном варианте осуществления образец включает, например, смесь опухолевых и нормальных клеток. В одном варианте осуществления образец содержит по меньшей мере 10%, 15%, 20% и т. д., 90% или 95% опухолевых клеток. Организм может представлять собой

животное, в том числе без ограничения такое животное, как корова, свинья, мышь, крыса, цыпленок, кошка, собака и т. д., и обычно представляет собой млекопитающее, такое как человек.

**[00064]** Термин "лечение" в его различных грамматических формах в отношении настоящего изобретения обозначает предупреждение (т. е. химиопрофилактику), излечение, обратное развитие, ослабление, уменьшение интенсивности, сведение к минимуму, подавление или остановку проявления вредоносных эффектов болезненного состояния, прогрессирования заболевания, возбудителя заболевания (например, бактерий или вирусов) или другого аномального состояния. Например, лечение может включать уменьшение интенсивности симптома (т. е. не обязательно всех симптомов) заболевания или уменьшение интенсивности прогрессирования заболевания.

**[00065]** "Лечение или предупреждение аутоиммунных реакций" или "лечение или предупреждение" другого болезненного состояния, такого как рак, инфекция, воспаление, аллергия, отторжение трансплантата, реакция "трансплантат против хозяина" и другие состояния, где антитела к CD154, вероятно, имеют терапевтическое преимущество, как используется в данном документе, относится к частичному или полному ингибированию, замедлению или предупреждению прогрессирования заболевания. В случае рака это означает лечение или ингибирование метастазирования рака; ингибирование, замедление или предупреждение рецидивирования рака, в том числе метастазирования рака; или предупреждение возникновения или развития рака (химиопрофилактика) у млекопитающего, например, человека. Кроме того, способы по настоящему изобретению можно осуществлять на практике для лечения пациентов-людей с раком. Однако, также вполне вероятно, что способы также будут эффективны в лечении рака у других млекопитающих. В предпочтительных вариантах осуществления рассматриваемые антитела применяются для лечения аутоиммунных реакций, аллергии, воспаления, отторжения трансплантата, GVHD, отторжения костномозгового трансплантата (ВМТ) и для индукции антигенспецифической толерантности или продолжительной антигенспецифической иммуносупрессии, в частности подавления

дифференцировки, активации и/или пролиферации Т-клеток и/или В-клеток у субъектов, нуждающихся в этом. Предпочтительные показания включают рассеянный склероз, волчанку или SLE, ITP, IBD, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, псориаз, увеит, ревматоидный артрит, астму, GVHD, отторжение костномозгового трансплантата, диабет, ревматоидный артрит, псориаз, отторжение клеточного трансплантата, отторжение тканевого трансплантата, отторжение органного трансплантата, отторжение костномозгового трансплантата, клеточную или генную терапию, оофорит и тиреоидит.

**[00066]** Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" предназначен для определения количества средства для лечения в терапевтическом режиме, необходимого для лечения состояния, например, аутоиммунных реакций, аллергии, воспаления, GVHD или отторжения трансплантата, или для уменьшения или устранения иммунного ответа, в особенности Т-клеточного или В-клеточного иммунного ответа на антиген, такой как аутоантиген, аллерген, вызывающий воспаление агент, трансплантированная клетка, ткань или орган, или на лекарственное средство, такое как биологическое, например, терапевтическое антитело, слитый белок на основе Ig, гормон, фактор роста или другой терапевтический белок или полипептид.

**[00067]** Используемый в данном документе термин "профилактически эффективное количество" предназначен для определения количества средства для лечения в терапевтическом режиме, необходимого для предупреждения состояния или прогрессирования симптомов заболевания, например, аутоиммунных реакций, аллергии, воспаления, GVHD или отторжения трансплантата, реакции на лекарственное средство или реакции отторжения.

**[00068]** В настоящем изобретении предусмотрено улучшенное антитело к CD154 для применения в терапии у человека, которое было получено из гуманизированного антитела IDEC-131, разработанного IDEC Pharmaceuticals (теперь BiogenIDEC). IDEC-

131 представляет собой высокоаффинное антитело, которое, как обнаружено с помощью VIAcore, при 25°C связывается с CD154 человека с  $K_D$  151 пМ.

[00069] IDEC131 представляет собой гуманизированное антитело к CD154, принадлежащее изотипу IgG1 человека, которое было получено из мышиного антитела к CD154 человека (24-31), которое раскрыто в патенте США № 5747037. Линия клеток гибридомы, секретирующая 24-31, которая является коммерчески доступной, была депонирована в американской коллекции типовых культур, и депонированной линии клеток присвоен № доступа в ATCC HB1712.

[00070] Последовательность IDEC-131 и его применение в лечении различных показаний аллергического, аутоиммунного и воспалительного характера и для подавления опосредованных Т- и В-клетками иммунных ответов раскрыто в патенте США № 6001358; 6440418; 6506383; 7074406 и 7122187. На основании его свойств, в том числе его сильных иммуносупрессивных эффектов на Т- и В-клеточный иммунитет и высокой аффинности, IDEC-131 продвинулся на стадию клинических испытаний с участием людей. В частности, IDEC-131 применяли в финансируемых IDEC клинических испытаниях с участием людей для лечения 2 показаний аутоиммунного характера, т. е. идиопатической тромбоцитопенической пурпуры ("ITP") и ремиттирующего/рецидивирующего рассеянного склероза ("RR-MS"). Несмотря на то, что эти клинические испытания IDEC-131 показали некоторую клиническую эффективность (хотя у относительно небольшого числа пациентов на очень ранней стадии), они были остановлены после сообщения о том, что другое IgG1-антитело к CD154 человека, разработанное Biogen, также полученное из мышиного антитела к CD154 человека (мышиного антитела 5с8, выделенного Сетом Ледерманом в Колумбийском университете), вызывало нежелательные эффекты у пациентов-людей. В частности, при применении в клинических испытаниях подвергнутого химеризации антитела 5с8 от Biogen возникали нежелательные явления в виде тромбообразования ("TE"), которые приводили к инсульту и летальному исходу у нескольких пациентов, участвующих

в клиническом испытании. Настоящее изобретение преодолевает эти проблемы ввиду получения других преимуществ в отношении фармакокинетики по сравнению с IDEC-131.

[00071] Для сравнения, в настоящем изобретении предусмотрен гуманизированный вариант антитела к CD154 человека, полученный из IDEC-131, который подобно IDEC-131 принадлежит к изотипу IgG1 человека, однако его Fc-область была сконструирована так, чтобы устранить как связывание FcR, так и активацию системы комплемента. В частности, его константная область сконструирована так, что она содержит мутации E269R и K322A (при этом эти мутированные остатки пронумерованы в соответствии с системой нумерации антител по Kabat). Эти мутации соответственно приводят к снижению связыванию с FcγRIIa и с C1q. В частности, полученное модифицированное антитело характеризуется ограниченным связыванием FcR/C1q, т. е. оно не связывается с FcRγ2 или FcRγ3 на тромбоцитах и не связывается с системой комплемента или не активирует ее. В отличие от этого, на его связывание с FcRn влияние не оказывается. Как раскрывается ниже и подкрепляется экспериментальными данными, раскрытыми в данном документе, IgG1-антитела к CD154, содержащие эти мутации, при проведении анализов в разных экспериментальных моделях не характеризовались какими-либо обнаруживаемыми протромботическими активностями *in vitro* или *in vivo* в отношении тромбоцитов мыши или человека.

[00072] Также последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей IDEC-131 дополнительно конструировали с помощью созревания аффинности. Созревание аффинности осуществляли с надеждой на повышение аффинности связывания полученного антитела к CD154 человека по сравнению с IDEC-131, поддерживая при этом его требуемые иммуносупрессивные свойства. Однако этот результат был отнюдь не гарантирован, поскольку, как упоминалось, IDEC-131 уже обладал сильной аффинностью связывания с CD154 человека (161 пМ) и эффективно подавлял иммунный ответ в разных моделях (моделях ЕАЕ, подавления гуморального иммунного ответа и аллоспецифической толерантности).

[00073] После проведения многочисленных экспериментов и последующих способов скрининга получали мутированные версии переменной области тяжелой и легкой цепей IDEC-131, из которых получали гуманизированные антитела (в том числе INX021), обладающие улучшенной аффинностью по сравнению с IDEC-131. Конкретно, получали INX021, а также 12 других вариантов. Эти гуманизированные варианты оценивали, и INX021 было выбрано в качестве основного кандидата для терапии у человека на основании его значимого с практической точки зрения связывания (аффинность к CD154 человека  $\approx$  в 5 раз выше, чем у IDEC-131), а также оно обладало лучшими функциональными (иммуносупрессивными) свойствами по сравнению с IDEC-131, а также по сравнению с другими вариантами.

[00074] Как показано на **фигурах 1А-С** (на которых представлены последовательности гуманизированного IgG1-антитела к CD154 человека по настоящему изобретению, INX021), это антитело содержит две мутации в CDR3 тяжелой цепи, три мутации в CDR1 легкой цепи и две мутации в CDR3 легкой цепи (по сравнению с IDEC-131). Следовательно, в общей сложности было модифицировано 7 остатков CDR. Неожиданным образом, как показано ниже, полученное гуманизированное антитело к CD154 человека связывается с CD154 человека с аффинностью, приблизительно в 5 раз превышающей таковую у исходного антитела, которое, как отмечалось ранее, само по себе связывается с CD154 человека с очень высокой аффинностью. Это удивительно, поскольку даже одна модификация в CDR может оказывать существенные эффекты на аффинность связывания антитела. Также непредсказуемым было то, что аффинность антител с уже относительно высокой аффинностью может быть улучшена.

[00075] Это модифицированное гуманизированное антитело при проведении анализов в разных моделях *in vitro* и *in vivo* обладало очень сильными иммуносупрессивными свойствами. Конкретно, INX021 эффективно подавляло гуморальный иммунитет, ЕАЕ и индуцировало аллоспецифическую толерантность или продолжительное отсутствие антигенспецифической Т-клеточной реактивности. Как показано

ниже, INX021 вызывает более сильное ингибирование управляемой CD154 Т-клетками активации В-клеток по сравнению с IDEC-131.

**[00076]** Следовательно, антитело по настоящему изобретению (по сравнению с IDEC-131):

(i) обладает аффинностью связывания с CD154 человека, превышающей в 5 раз таковую у IDEC-131,

(ii) оно более эффективно вызывает иммуносупрессивные виды активности по сравнению с IDEC-131,

(iii) подобно IDEC-131 оно подавляет Т- и В-клеточный (гуморальный) иммунитет, например, оно подавляет ЕАЕ и оно индуцирует аллоспецифическую толерантность, и

(iv) оно характеризуется улучшенным профилем безопасности по сравнению с IDEC-131 благодаря мутациям в Fc-области, которые существенно снижают связывание FcR и C1q, и, как следствие, оно не проявляет каких-либо обнаруживаемых протромботических активностей *in vitro* или *in vivo* в отношении тромбоцитов мыши или человека.

**[00077]** С учетом этих комплексных свойств рассматриваемое антитело к CD154 человека хорошо подходит для применения в терапии у человека, так как оно должно характеризоваться повышенным профилем безопасности у пациентов и должно быть более сильным, и, следовательно, более эффективным, чем IDEC-131. Предполагается, что повышенная аффинность связывания этого антитела должна облегчать его введение посредством подкожного введения дозы. Это является значимым с практической точки зрения для его потенциального применения в лечении показаний у человека хронического характера.

**[00078]** Также рассматриваемое антитело благодаря тому, что является интактным, т. е. оно содержит полноразмерный IgG1, может обеспечить преимущества в отношении фармакокинетики и безопасности пегилированному Fab, разработанному Biogen/UCB, и CD154-специфическому диателу, разработанному Bristol Meyers Squibb.

**[00079]** Кроме того, поскольку рассматриваемое антитело обладает более высокой специфической активностью, это может дополнительно улучшать дозирование, так как, вероятно, антитело

можно вводить менее часто. Это важно, так как большинство применений рассматриваемого антитела предназначены для лечения показаний у человека хронического аутоиммунного, аллергического или воспалительного характера, при этом повторное введение доз будет требоваться для любого эффективного терапевтического режима. В частности, антитело по настоящему изобретению должно хорошо подходить для схем лечения, при которых В- или Т-клеточная иммуносупрессия требуется с терапевтической точки зрения.

[00080] Следовательно, в настоящей заявке заявитель предусматривает новые и улучшенные гуманизированные антитела к CD154 человека для применения в иммунотерапии у человека, обладающие улучшенной аффинностью и другими фармакокинетическими свойствами, которые не должны вызывать токсичность у пациентов-людей, в частности эти антитела не должны вызывать агрегацию тромбоцитов или тромбоэмболические осложнения у субъектов-людей, и более того, с учетом их дополнительной способности не связывать и активировать систему комплемента, они дополнительно не должны опосредовать ADCC или CDC опосредованную цитотоксичность. Как показано в примерах, антитело по настоящему изобретению обладает существенно улучшенными функциональными и фармакокинетическими свойствами по сравнению с IDEC131 и другим антителом к CD154, ранее применяемыми в терапии у человека. Следовательно, это антитело должно обеспечивать клинические благоприятные эффекты при применении в терапии у человека.

[00081] Несмотря на то, что антитело INX021 по настоящему изобретению содержит 2 мутации, которые соответственно снижают связывание Fc $\gamma$ 2 и 3 и связывание C1q, дополнительно предполагается, что можно вводить и другие мутации в Fc-области, которые могут дополнительно снизить связывание с другими Fc-рецепторами или системой комплемента или изменить другие эффекторные функции. Примеры других возможных мутаций известны из уровня техники, например, Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. ("High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc $\gamma$ RI, Fc for Fc $\gamma$ RII, Fc for Fc $\gamma$ RIII, and FcRn")

сообщают о разработке вариантов IgG1 с ослабленным связыванием Fc с FcγR. *J Biol. Chem.* 2001; 276: 6591-604). Кроме того, в US20070237767 и US20100104564 описан мутагенез Fc для устранения связывания FcR. Также конкретные мутации в Fc и их эффекты перечислены в таблицах 1-3 ниже. Предполагается, что эти мутации являются иллюстративными и не исчерпывают другие мутации и их комбинации, которые, как известно, повышают или ослабляют эффекторные функции Fc, такие как связывание FcR, связывание системы комплемента, гликозилирование, активность ADCC, активность CDC, связывание FcRN, среди прочих.

**Таблица 1** (из Shields et al., "High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for FcγRI, Fc for FcγRII, Fc for FcγRIII, and FcRn", *J Biol Chem* 2001; 276: 6591-604)

Мутация в Fc	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIIa	FcRn
E233P	0,12	0,08	0,12	0,04	0,54
D265A	0,16	0,07	0,13	0,09	1,23
D265N		0,02	0,03	0,02	
D270N		0,03	0,05	0,04	
N297A	0,15	0,05	0,1	0,03	0,8
S298N		0,05	0,08	0,06	
P329A	0,48	0,08	0,12	0,21	0,8
D270A	0,76	0,06	0,1	0,14	1,05

**Таблица 2** (из US20100104564)

Мутация в Fc	FcγRI	FcγRIIa (H131)	FcγRIIa (R131)	FcγRIIb	FcγRIIIa (V158)	FcγIIIIa (F158)
K326V	0,52	0,01	0,01	0,02	0,87	2,34
V369R	0,79	0,01	0,02	0,03	0,93	1,64
F405K	1,52	0,02	0,02	0,02	1,08	2,55
L410P	1,27	0,01	0,01	0,01	0,99	1,75
V427R	1,69	0,03	0,05	0,03	1,27	0,59

**Таблица 3** (из US20070237767)

№ варианта	Мутация в Fc	FcγRI	FcγRI Ia	FcγRI Ib	FcγRI Ic	FcγRII Ia	C1q	FcRn
113	L234N	0,1	0,19	2,05		0,49	1,18	1,06
744	G237M	0,07	0,14	0,57	0,66	0,1	1,8	1,74
88	S239F	0,28	0,02	0,33		0,1	0,95	0,85
826	V262E	1,03	0,16	0,92	36,47		2,85	9,27
76	V264F	0,43	0,05	0,22		0,06	1,87	1,07
143	V266T	0,28	0,1	0,16	0,18		1,21	0,53
228	S267N	0,72	0,08			0,27	3,18	0,85
148	E269R	0,07	0,07	0,13	0,06	0,05	1,15	0,72

779	N286E		0,07	0,38	0,37	0,01	0	2,12
858	N297R	0,01	0,01	0,01	0,06	0,01		0,45
80	T299A	0,01	0,1	0,56	72,84	0,06	2,31	0,82
870	R301D	0,87	0,11	0,06	0,04	0,03	1,58	0,5
84	N325L	0,42	0,04	1,46		0,03	2,18	0,91
161	N325E	1,34	0,09	0,05	0,03	<0,02	0,86	0,55
473	L328R	0,07	0,1	0,88	0,37	0,11	1,21	1,82

**[00082]** С учетом этой комбинации свойств в отношении безопасности, функциональности и фармакокинетики гуманизированные IgG1-антитела к CD154 человека по настоящему изобретению можно применять для лечения или предупреждения состояний, при которых подавление активации, дифференцировки и пролиферации Т- и/или В-клеток требуется с терапевтической точки зрения, таких как аллергические, аутоиммунные состояния, отторжение трансплантата (алло- или ксеногенных органов, клеточных, тканевых трансплантатов) и воспалительные состояния. Их конкретные неограничивающие примеры включают, в качестве примера, рассеянный склероз, системную красную волчанку (SLE), другие формы волчанки, аутоиммунную тромбоцитопению (ITP), отторжение почечного трансплантата, отторжение трансплантата кожи и островковых клеток, ревматоидный артрит, саркоидоз, псориаз, псориатический артрит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, COPD, астму, диабет, тиреоидит, реакцию "трансплантат против хозяина", трансплантацию костного мозга (BM) или гемопоэтических стволовых клеток и атеросклероз. Также некоторые из этих вариантов, в том числе INX021, обладают повышенной специфической активностью/эффективностью, в том числе способностью вызывать толерантность *in vivo*.

**[00083]** Как видно из экспериментальных данных, особенно предполагаемое применение антител по настоящему изобретению, в том числе INX021, предназначено для уменьшения интенсивности или предупреждения реакций на лекарственное средство, в частности реакций, вызванных в ответ на биологические препараты и другие лекарственные средства, такие как терапевтические антитела, слитые белки, гормоны, факторы роста, ферменты, пептиды, антибиотики, противовирусные препараты и т. п. Это может обеспечить возможность введения этих лекарственных средств в течение более продолжительного периода времени, может увеличить

число пациентов, которые отвечают на лекарственное средство, и/или может способствовать эффективности лекарственного препарата у пациентов, не получавших лечение.

[00084] Как обсуждается в данном документе, известно, что другие участки в Fc-области IgG1 человека и другие константные области человека участвуют в связывании и/или активации системы комплемента, а также в связывании FcR. Соответственно, описанные мутации являются иллюстративными соответствующими мутациями в Fc-области IgG1 или IgG3 или других антител, которые приводят к утрате одного или обоих из связывания системы комплемента и связывания FcR.

[00085] Индукцию толерантности или продолжительные (Т- или В-клеточные) иммуносупрессивные эффекты мутантных в отношении связывания системы комплемента вариантов  $\alpha$ CD154 или их вариантов можно оценить в хорошо изученной модели выживания кожного аллотрансплантата, несовпадающего по гаплотипу, в которой долговременная толерантность индуцируется с помощью введения  $\alpha$ CD154 и аллоантигена. Однако другие модели толерантности можно альтернативно применять для оценивания способности вариантов  $\alpha$ CD154, лишенных способности связывать систему комплемента и/или лишенных способности связывать FcR (содержащих мутированную Fc-область), индуцировать толерантность.

[00086] Тромбоэмболические активности мутированных по FcR  $\alpha$ CD154 можно тестировать в мышинной модели, экспрессирующей рецептор Fc $\gamma$ RIIA человека, которая воспроизводит явления, наблюдаемые у NHP (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594). У таких мышей обработка с помощью  $\alpha$ CD154 (антитела к CD154 мыши) индуцирует образование тромбов в легких; следовательно, утрата связывания FcR у антител к CD154, содержащих мутированные Fc-области человека (мутированные

константные области IgG1), устраняет или заметно снижает образование тромбов. С использованием этой или аналогичных моделей можно определять эффекты конкретных мутаций в Fc на токсичность, ассоциированную с терапией  $\alpha$ CD154.

**[00087]** Опять-таки, мутированные специфические антитела к CD154 по настоящему изобретению, которые получены из IDEC-131, можно применять для лечения и предупреждения любого состояния, при котором противодействие эффектам CD154, в том числе передачи сигнала CD154/CD40, или блокирование или ингибирование связывания CD154 с CD40 может быть эффективным с терапевтической точки зрения и может снижать проявление симптомов заболевания. Их примеры включают лечение аллергических, аутоиммунных состояний, рака, отторжения трансплантата, GVHD, воспалительных и других состояний, в особенности состояний, при которых индукция толерантности и/или подавление гуморального иммунитета или Т-клеточного иммунитета требуется с терапевтической точки зрения. Конкретные примеры включают рассеянный склероз, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, тиреоидит, красную волчанку, аутоиммунную тромбоцитопению, диабет, реакцию "трансплантат против хозяина", клеточную терапию, отторжение органного и тканевого трансплантата, например, кожи, почки, поджелудочной железы, костного мозга, атеросклероз и другие состояния, при которых требуется подавление гуморального или Т-клеточного ответа.

**[00088]** Рассматриваемые антитела, которые нацеливаются на CD154, обладают улучшенными свойствами безопасности, имеют большой терапевтический потенциал, так как CD154 является чрезвычайно привлекательной мишенью для иммунологического вмешательства в широком спектре аутоиммунных и связанных с трансплантатами заболеваний. Фактически все модели аутоиммунных заболеваний у мышей, протестированные на сегодняшний день, ослаблялись с терапевтической точки зрения с помощью обработки  $\alpha$ CD154. Помимо простого блокирования взаимодействий CD154-CD40 терапия  $\alpha$ CD154 приводит к индукции иммунологической толерантности (предупреждение отторжения трансплантата путем

блокирования взаимодействий CD40-CD154 неоднократно документально подтверждалось в отношении индукции долговременной толерантности к коже, Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. and Greiner, D. L., "Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody", *Diabetes* 1998. 47: 1199-1206; Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation* 1997. 64: 329-335; Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "CD154 on the surface of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance", *Transplantation* 2003. 76: 1375-1379; Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920-1926; Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. and Wade, W. F., "Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice", *J Immunother* 2003. 26: 72-84; Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. and Burns, C., "Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis", *Arth Rheum.* 2003.; Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. and Kirk, A. D., "Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates, *Transplantation*", 2001. 72: 1473-1478, островковым клеткам (Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. and Korsgren, O., "Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice", *Cell Transplantation* 2002. 11: 715-720), костному мозгу

(Wekerle, T. and Sykes, M., "Mixed chimerism and transplantation tolerance", *Annual Review of Medicine* 2001, 52: 353-37019, и множеству других трансплантированных органов (Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. and Tremblay, J. P., "Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation", *Transplantation* 2002. 73: 453-461; Tung, T. H., Mackinnon, S. E. and Mohanakumar, T., "Long-term limb allograft survival using anti-CD154 antibody in a murine model", *Transplantation*" 2003. 75: 644-650). Кроме того, у NHP было показано, что  $\alpha$ CD154 человека индуцирует долговременную толерантность к аллогенным кожным трансплантатам.

Общее описание способов по настоящему изобретению для получения антител по настоящему изобретению

**Иллюстративный способ синтеза антител по настоящему изобретению**

[00089] ДНК, кодирующую  $V_H$  и  $V_L$  антитела хомячка к CD154 мыши, или IDEC-131, или варианта, раскрытого в данном документе, клонировали и сливали с ДНК, кодирующей CH1, CH2, CH3 область  $\gamma 1$  человека, или с вариантами IgG1, раскрытыми в данном документе. Нуклеотидные последовательности подтверждали с применением секвенатора Megabase™. Плазмидным вектором экспрессии, pEE12, содержащим как тяжелую, так и легкую цепи каждого из вариантов MR1, трансфицировали клетки NS0 и продукты очищали в помощьью хроматографии на белке А.

#### ***Связывание антител по настоящему изобретению с CD154***

[00090] Сравнение активности связывания вариантов антитела к CD154 определяли по их связыванию с клетками CHO, трансфицированными CD154 мыши. CD154-экспрессирующие клетки CHO инкубировали с меченым биотином  $\alpha$ CD154 в присутствии немеченных вариантов тяжелой цепи  $\alpha$ CD154 или родственных по изотипу антител в течение 1 ч. при 4°C. Связывание биотинилированного MR1 обнаруживали с помощью конъюгированного со стрептавидином флуорохрома и выполняли проточную цитометрию. Процент ингибирования вариантами можно определить путем регистрации

значений снижения средней интенсивности флуоресценции окрашенных MR1 клеток.

**Период полувыведения антител с применением ELISA**

[00091] ELISA или Biacore можно применять для определения периода полувыведения *in vivo* вариантов IgG1-антитела человека. Концентрации hIgG1 в сыворотке крови можно определять в установленное время, например, через 1 месяц после введения.

**Связывание вариантов с FcR**

[00092] Связывание вариантов IgG1-mAb с FcR можно определить с помощью твердофазного анализа. Вкратце, планшеты для ELISA Maxisorb можно покрыть FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIIIA мыши или человека (R & D Systems). Можно получить биотинилированные версии вариантов. Связывание можно определить с помощью колориметрического обнаружения с применением связанного с ферментом авидина. Снижение связывания определяют для варианта при сравнении с молекулой WT.

**Связывание mAb αCD154 с C1q человека**

[00093] Это можно осуществлять с применением известных способов или как описано в данном документе. Очищенный C1q человека можно титровать в лунки планшетов для ELISA Maxisorb, в которые были абсорбированы варианты IgG1 MR1 или IDEC-131. Связанный C1q будет обнаруживаться с помощью меченого HRP антитела цыпленка к C1q. Все варианты будут сравниваться со связыванием C1q с IgG1 MR1 WT, как описывается в (Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge", *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594.; и Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. and Blazar, B. R., "Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions", *Blood* 2002. 100: 3400-3407).

**Индукция толерантности мутантными mAb  $\alpha$ CD154**

[00094] Способность антитела к CD154 вызывать толерантность или продолжительную иммуносупрессию можно определить известными способами и, конкретно, как описано в данном документе. Антитело хомячка к CD154 мыши, которое получали в лаборатории авторов настоящего изобретения, MR1, обычно индуцирует долгосрочную толерантность к трансплантату, как было показано в (Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920-1926; Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J., "Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation", *J Immunol* 2005. 175: 771-779; Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. and Greiner, D. L., "Induction of immunological tolerance to islet allografts", *Cell Transplant* 1996. 5: 49-52).

[00095] Толерантность индуцируется совместным введением аллоантигена (в форме донорских клеток селезенки) и  $\alpha$ CD154. Было показано, что MR1 в форме гуманизированного IgG1 также индуцирует толерантность к трансплантату, и, следовательно, вариант  $\gamma$ 1 WT будет служить в качестве положительного контроля для индукции толерантности. Мутантные версии MR1, у которых была утрачена способность связывать систему комплемента, будут тестировать в отношении их способности индуцировать толерантность к трансплантату.

[00096] Трансплантацию кожи выполняют по модифицированной методике, применяемой Markees et al. (12). Вкратце, самцов мышей СВ6F1 одного возраста будут использовать в качестве доноров как клеток селезенки (DST), так и кожных трансплантатов. Мышам-реципиентам С57BL/6 будут инъецировать  $5 \times 10^7$  клеток DST в 500 мкл сбалансированного солевого раствора Хенкса с помощью инъекции в хвостовую вену (внутривенно) или не будут инъецировать их, а

также 500 мкг  $\alpha$ CD154 WT, или мутантного  $\alpha$ CD154, или контрольного иммуноглобулина хомячка или человека (HIgG1) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) внутривнутрибрюшинно в дни -3, -5 и -7. Мышей будут обрабатывать соответствующим антителом (250 мкг/инъекция) 3 раза в неделю, а затем в течение всего эксперимента. В день 0 мышей-реципиентов будут подвергать анестезии с помощью 50 мкг на грамм веса тела каждого из кетамина и ксилазина, инъецируемых внутривнутрибрюшинно (15 мг/мл в PBS), и кожные трансплантаты от СВ6F1 будут получать с помощью общепринятых способов. Отторжение будет определяться по дню, в который останется менее 20% кожного трансплантата. Оценку в отношении отторжения кожного трансплантата у животных будут проводить в течение 100 дней. Кроме того, у каждой из групп с толерантностью кожные трансплантаты будут забирать в день 100 и оценивать с помощью гистохимического анализа в отношении лейкоцитарных инфильтратов и оценивать в баллах на основании числа клеток/измеряемой площади. Наконец, трансплантаты от стороннего производителя (H-2Kskin) будут трансплантировать мышам с индуцированной толерантностью (в выбранных группах), чтобы удостовериться, что индуцированная толерантность является антигенспецифичной, как было опубликовано ранее для этой системы (Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation* 1997. 64: 329-335, Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody", *Transplant Proc* 1998. 30: 2444-2446; Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation", *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814-815) гуморального иммунитета с мутантными mAb  $\alpha$ CD154.

**[00097]** В дополнение к измерению влияния мутаций в отношении системы комплемента и FcR на толерантность также будут анализировать влияние обработки антителом на развитие первичного и вторичного гуморальных иммунных ответов, как описано ранее. Вкратце, мышей (4/группа) будут иммунизировать овалбумином цыпленка в CFA (200 мкг/мышь) и обрабатывать вариантами MR1 (200 мкг/мышь x 3 раза/неделя). В дни 7, 14 и 21 уровень IgM и IgG к OVA будут измерять с помощью стандартизированного ELISA в отношении антител к OVA и количественно определять концентрации антител к OVA в сыворотке крови.

**Исследования токсичности mAb  $\alpha$ CD154 по настоящему изобретению**

**[00098]** Тромбогенную активность  $\alpha$ CD154 демонстрировали на мышинной модели с использованием мышей, которые экспрессируют Fc $\gamma$ RIIA человека. Эта модель уподобляет результаты токсичности у NHP с использованием как интактной, так и агликозилированной форм антитела к CD154 человека. Вкратце, мышам будут инъектировать предварительно образованные иммунные комплексы (IC) sCD154 (R & D Systems) и каждый вариант  $\alpha$ CD154 (138 мкг mAb и 50 мкг Ag, соответствующий примерно 500 нМ IC при стехиометрическом соотношении 1:3 (mAb/Ag)). После инъекции, если смесь является тромболитической, у мышей будет проявляться продолжительная дезориентация, учащенное дыхание и нарушение двигательной функции. Ожидается, что те, которые проявляют такую активность, оказывают существенное снижение на количество тромбоцитов. Через 60 минут легкие будут собирать, фиксировать в формалине, получать срезы и окрашивать с помощью H&E. Срезы легких мышей будут оценивать на предмет наличия тромбоза (измеряемого по внутрисосудистым тромбам) и будут подсчитывать число тромбов/срез. От каждой мыши будут подсчитывать 10 срезов и общее число тромбов сравнивать между всеми группами, получавшими обработку различными вариантами IgG1 MR1. Кроме того, общее количество тромбоцитов (собранных посредством пункции сердца во время эвтанази) будут оценивать с помощью проточной цитометрии, и оно, как ожидается, будет снижаться на 80% с использованием

тех антител, которые являются тромбогенными. Эти результаты будут определять, какие из вариантов MR1 (связывание FcR (N325L, K326V, E269R)) являются тромбогенными, и оказывает ли изменение связывания FcR влияние на изменение этой активности.

**Блокирование развития опосредуемого Т-клетками аутоиммунного заболевания, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ)**

[00099] Самок мышей C57BL/6 возрастом 5-8 недель будут иммунизировать подкожным введением 200 мкг пептида MOG35-55, эмульгированного в CFA, дополненном 5 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*. Мыши будут получать внутрибрюшинные инъекции 250 нг коклюшного токсина во время иммунизации и спустя 48 часов. Через 7 дней мышам будут проводить аналогичную бустерную иммунизацию с MOG/CFA без коклюшного токсина. Клинические проявления болезни обычно начинаются в промежутке между днем 16 и днем 20 после иммунизации. Мышам будут вводить каждый из вариантов MR1, IgG человека (в качестве контроля для вариантов), Ig хомячка (в качестве контроля для MR1) или MR1 хомячка (200 мкг/мышь 3х/неделя) на протяжении всего эксперимента (50 дней).

[000100] Клиническая оценка. Мышей будут оценивать в баллах четыре раза в неделю следующим образом: 0, отсутствие обнаруживаемых признаков ЕАЕ; 0,5, потеря тонуса в дистальной части хвоста; 1, полная потеря тонуса в хвосте; 1,5, потеря тонуса в хвосте и слабость задних конечностей; 2, односторонний частичный паралич задних конечностей; 2,5, двусторонний частичный паралич задних конечностей; 3, полный двусторонний паралич задних конечностей; 3,5, полный паралич задних конечностей и односторонний паралич передних конечностей; 4, полный паралич как передних конечностей, так и задних конечностей; 5, смерть. Мышей с баллом оценки, превышающим 4, но меньшим, чем 5, будут подвергать эвтаназии.

**Определение токсичности**

[000101] Требуемое антитело в соответствии с настоящим изобретением будет характеризоваться значительно сниженной токсичностью или ее отсутствием в раскрытой животной модели тромбоза. С помощью моделей, описанных выше, будет показано, что

IgG1-антитела к CD154, где константные области тяжелой цепи содержат мутацию E269R и мутацию K322A (в соответствии со схемой нумерации по Kabat), не вызывают агрегацию тромбоцитов.

**Определение эффективности**

[000102] Эффективность (индукцию толерантности) можно оценивать в моделях толерантности к кожному трансплантату, как описано выше.

**Фармацевтические и диагностические применения антитела к hCD154 по настоящему изобретению**

[000103] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать иммунный ответ у субъекта. Антитело по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят субъекту в эффективном для ингибирования количестве.

[000104] В определенных вариантах осуществления "эффективное для ингибирования количество" антитела к CD154 или фармацевтической композиции, содержащей антитело, представляет собой любое количество, которое является эффективным для ингибирования взаимодействия CD154-CD40 у субъекта, которому их вводят. Способы определения "количества, обеспечивающего ингибирование" хорошо известны специалистам в данной области техники, и оно зависит от определенных факторов, в том числе без ограничения типа вовлекаемого субъекта, метрических данных и возраста субъекта и фармакокинетических свойств конкретного доставляемого терапевтического средства.

[000105] В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать иммунный ответ за счет ингибирования взаимодействия CD154-CD40.

[000106] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать воспаление. Для целей настоящего изобретения воспалительные ответы характеризуются покраснением, опуханием,

жаром и болью, как следствия расширения капилляров, с отеком и миграцией фагоцитирующих лейкоцитов. Некоторые примеры воспалительных ответов включают артрит, контактный дерматит, синдром гиперпродукции IgE, воспалительное заболевание кишечника, аллергическую астму и идиопатическое воспалительное заболевание. Идиопатическое воспалительное заболевание включает, например, псориаз и волчанку (например, системную красную волчанку (SLE), лекарственную красную волчанку и волчаночный нефрит). См., например, Gallin 1989. *Fundamental Immunology*, главу 26, Raven Press, 2-е изд., стр. 721-733, New York. В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения или предупреждения симптома системной красной волчанки (SLE) у индивидуума, при этом способ включает введение индивидууму антитела к CD154 по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения или предупреждения симптома SLE.

[000107] Некоторые примеры артрита включают ревматоидный артрит, неревматоидный артрит, артрит, ассоциированный с болезнью Лайма, и воспалительный остеоартрит. Некоторые примеры идиопатического воспалительного заболевания включают псориаз и системную волчанку. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать отторжение организмом субъекта трансплантированного органа.

[000108] В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать отторжение организмом субъекта трансплантированных сердца, почки, печени, кожи, островковых клеток поджелудочной железы или костного мозга.

[000109] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать реакцию "трансплантат против хозяина" у субъекта.

[000110] В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны

ингибировать аллергические ответы у субъекта, например, сенную лихорадку или аллергию на пенициллин или другие лекарственные средства.

[000111] В одном аспекте рассматриваемые антитела к CD154, в том числе INX021, пригодны для уменьшения интенсивности или предупреждения реакций на лекарственное средство, в частности реакций в ответ на биологические препараты и другие лекарственные средства, такие как терапевтические антитела, слитые белки, гормоны, факторы роста, ферменты, пептиды, антибиотики, противовирусные препараты и т. п. Это может обеспечить возможность введения этих лекарственных средств в течение более продолжительного периода времени, может увеличить число пациентов, которые отвечают на лекарственное средство, и/или может способствовать эффективности лекарственного препарата у пациентов, не получавших лечение. Их примеры известны из уровня техники, и включают хумиру, энбрел, ритуксан, ксолар, герцептин и авастин.

[000112] Другие примеры терапевтических антител, где рассматриваемые антитела к CD154 можно применять для предупреждения или уменьшения интенсивности реакции в ответ на лекарственное средство, включают следующие: 3F8, 8Н9, абаговомаб, абциксимаб, абитузумаб, абрилумаб, актоксумаб, адалимумаб, адекатумумаб, адуканумаб, афасевикумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб пэгол, ALD518, алемтузумаб, алирокумаб, алтумомаб пентетат, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анетумаб равтансин, анифролумаб, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, аскринвакумаб, аселизумаб, атезолизумаб, атинумаб, атлизумаб (= тоцилизумаб), аторолимумаб, авелумаб, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, бегеломаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, бесилезомаб, бевацизумаб, безлотоксумаб, бициромаб, бимагрумаб, бимекизумаб, биватузумаб мертансин, блеселумаб, блинатумомаб, блонтуветмаб, блосозумаб, бокоцизумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, бролуцизумаб, бронтиктузумаб, кабирализумаб, канакинумаб, кантузумаб мертансин, кантузумаб равтансин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, каротуксимаб, катумаксумаб,

иммуноконъюгат CBR96-доксорубин, цеделизумаб, цергутузумаб  
амуналейкин, цертолизумаб пэгол, цетуксимаб, Ch.14.18,  
цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб,  
кливатузумаб тетракетан, кодритузумаб, колтуксимаб равтансин,  
конатумумаб, концизумаб, кренезумаб, кротедумаб, CR6261,  
дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, дапиролизумаб пэгол,  
даратумумаб, дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин,  
денозумаб, дерлотуксимаб биотинилированный, детумомаб,  
динутуксимаб, диридавумаб, дапиролизумаб пэгол, даратумумаб,  
дектрекумаб, демцизумаб, денинтузумаб мафодотин, денозумаб,  
дерлотуксимаб биотинилированный, детумомаб, динутуксимаб,  
диридавумаб, домагрозумаб, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб,  
дулиготумаб, дупилумаб, дурвалумаб, дусигитумаб, экромексимаб,  
экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб,  
элделумаб, элгемтумаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб,  
элделумаб, элгемтумаб, элотузумаб, элсилимомаб, эмактузумаб,  
эмибетузумаб, эмицизумаб, энаватузумаб, энфортумаб ведотин,  
энлимомаб пэгол, эноблитузумаб, энокизумаб, энситуксимаб,  
эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эрлизумаб, эртумаксомаб,  
этарацизумаб, этролизумаб, эвинакумаб, эволокумаб, эксбивирумаб,  
фанолезомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, FBTA05, фелвизумаб,  
фезакинумаб, фибатузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фиривумаб,  
фланвотумаб, флетикумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб,  
фрезолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галканезумаб, галиксимаб,  
ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамицин,  
гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб,  
гомиликсимаб, гуселькумаб, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан,  
икрукумаб, идаруцизумаб, иговомаб, IMAV362, ималумаб, имциромаб,  
имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтансин, индусатумаб  
ведотин, инебилизумаб, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб,  
инотузумаб озогамицин, иплимумаб, иратумумаб, изатуксимаб,  
итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, ламбролизумаб,  
лампализумаб, ланаделумаб, лапритуксимаб эмтанзин, лебрикизумаб,  
лендализумаб, лензилумаб, лерделимумаб, лексатумумаб,  
либивирумаб, лифастузумаб ведотин, лигелизумаб, лилотомаб  
сатетраксетан, линтузумаб, лирилумаб, лоделцизумаб, локиветмаб,

лорвотузумаб мертанзин, лукатумумаб, лулизумаб пэгол, лумиликсимаб, лумретузумаб, мапатумумаб, маргетуксимаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, мирветуксимаб соравтанзин, митумомаб, могамулизумаб, монализумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-CD3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, наратуксимаб эмтанзин, нарнатумаб, натализумаб, навициксизумаб, навивумаб, небакумаб, нецитумумаб, немолизумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, онтуксизумаб, опицинумаб, опортузумаб монакокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, отлертузумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, памревлумаб, панитумумаб, панкомаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, пасотуксизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пембролизумаб, пемтумомаб, перакизумаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пинатузумаб ведотин, пинтумамаб, плакулумаб, плозализумаб, погализумаб, полатузумаб ведотин, понезумаб, презализумаб, приликсимаб, притоксаксимаб, притумумаб, PRO 140, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, ралпанцизумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, рефанезумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ринукумаб, ритуксимаб, ривабазумаб пэгол, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровалпитузумаб тезилин, ровелизумаб, руплизумаб, сацитумумаб говитекан, самализумаб, сапелизумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, серибантумаб, сетоксаксимаб, севирумаб, сибротузумаб, SGN-CD19A, SGN-CD33A, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, софитузумаб ведотин, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулезомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тамтуветмаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тарекстумаб, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тепротумумаб, тесидолумаб, тетулумаб, тезепелумаб, TGN1412,

тицилимумаб (тремелимумаб), тилдракизумаб, тигатузумаб, тимолумаб, тисотумаб ведотин, TNX-650, тоцилизумаб (атлизумаб), торализумаб, тосатоксумаб, тоситумомаб, товетумаб, тралокинумаб, трастузумаб, трастузумаб эмтанзин, TRBS07, трегализумаб, тремелимумаб, тревогрумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, улокуплумаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вадастуксимаб талирин, вандортузумаб, ведотин, вантуктумаб, вануцизумаб, вапаликсимаб, варлилумаб, вателизумаб, вепалимомаб, весенкумаб, визилизумаб, вобарилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, ксентузумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб и золимомаб аритокс.

**[000113]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать аутоиммунный ответ у субъекта, страдающего аутоиммунным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунный ответ ассоциирован с или обусловлен состоянием, выбранным из группы, состоящей из ревматоидного артрита, тяжелой миастении, системной красной волчанки, болезни Грейвса, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, гемолитической анемии, сахарного диабета, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, рассеянного склероза, псориаза, лекарственных аутоиммунных заболеваний или лекарственной волчанки. В определенных вариантах осуществления аутоиммунный ответ ассоциирован с или обусловлен системной красной волчанкой.

**[000114]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать аутоиммунный ответ у субъекта, страдающего от аутоиммунного ответа, который обусловлен инфекционным заболеванием.

**[000115]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать аутоиммунный ответ у субъекта, страдающего от аутоиммунного ответа, который обусловлен синдромом Рейтера,

спондилоартритом, болезнью Лайма, ВИЧ-инфекцией, сифилисом или туберкулезом.

**[000116]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать фиброз у субъекта.

**[000117]** Некоторые примеры фиброза включают легочный фиброз или фиброзное заболевание. Некоторые примеры легочного фиброза включают легочный фиброз на фоне синдрома расстройства дыхания у взрослых, лекарственный легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз или гиперчувствительный пневмонит. Некоторые примеры фиброзных заболеваний включают гепатит С; гепатит В; цирроз; цирроз печени на фоне токсического шока; цирроз печени на фоне приема лекарственных средств; цирроз печени на фоне вирусной инфекции и цирроз печени на фоне аутоиммунного заболевания.

**[000118]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать заболевание желудочно-кишечного тракта. Некоторые примеры заболевания желудочно-кишечного тракта включают пищеводную дискинезию, воспалительное заболевание кишечника (в том числе болезнь Крона и язвенный колит), гастрит, коллагенозный колит (в том числе лимфоцитарный колит и микроскопический колит), целиакию (также называемую глютеновой энтеропатией, целиакией-спру или непереносимостью глютена) и склеродермию.

**[000119]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать сосудистое заболевание. Некоторые примеры сосудистого заболевания включают атеросклероз, заболевание, поражающее почечные артерии, лимфедему, ишемические нарушения и реперфузионное повреждение. Также включены иммунокомплексные заболевания с коллагенозом сосудов, такие как системная красная волчанка или криоглобулинемия.

**[000120]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать пролиферацию опухолевых Т-клеток у субъекта, страдающего Т-клеточным раком, например, Т-клеточным лейкозом или лимфомой. Такие антитело к CD154 или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, можно вводить субъекту в количестве, эффективном для ингибирования пролиферации опухолевых Т-клеток у такого субъекта.

**[000121]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны ингибировать у субъекта вирусную инфекцию с поражением Т-клеток, вызываемую Т-лимфотропным вирусом человека типа 1 (HTLV I). Такие антитело к CD154 или фармацевтическую композицию, содержащую антитело, можно вводить субъекту в количестве, эффективном для ингибирования вирусной инфекции.

**[000122]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны визуализировать опухолевые клетки или неопластические клетки у субъекта, у которого экспрессируется белок CD154, с которым специфически связывается антитело по настоящему изобретению. Способ визуализации опухолевых клеток или неопластических клеток у субъекта включает стадии: введения субъекту эффективного количества антитела к CD154 по настоящему изобретению или композиции, содержащей его, в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом и белком на поверхности опухолевых клеток или неопластических клеток; и осуществление визуализации любого образованного комплекса антитело/белок, визуализируя тем самым любые опухолевые клетки или неопластические клетки у субъекта.

**[000123]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, способны обнаруживать наличие опухолевых клеток или неопластических

клеток у субъекта, у которого экспрессируется белок CD154, с которым специфически связывается антитело по настоящему изобретению. Один такой способ обнаружения наличия опухолевых клеток или неопластических клеток у субъекта включает стадии: введения субъекту эффективного количества антитела к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей его, в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом и белком; обеспечения выведения любого несвязанного визуализирующего средства из организма субъекта; и обнаружение наличия любого образованного комплекса антитело/белок, при этом наличие такого комплекса указывает на наличие опухолевых клеток или неопластических клеток у субъекта.

#### **Фармацевтические композиции**

[000124] В настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие CD154-связывающий белок, например, антитело к CD154, описываемое в настоящем изобретении.

[000125] В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антитело к CD154 по настоящему изобретению.

[000126] Антитела к CD154 по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, не вызывают тромбоз, в том числе тромбоемболические осложнения, и, следовательно, хорошо подходят для терапии у человека.

[000127] Такие фармацевтические композиции могут дополнительно содержать любое одно или несколько из фармацевтически приемлемого носителя, вспомогательного вещества, среды-носителя для доставки, буфера и/или стабилизатора. Иллюстративные методики составления и введения антител по настоящему изобретению можно найти, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., последнее издание.

[000128] В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор, физиологический раствор, воду, составы на основе

цитрата/сахарозы/Tween и эмульсии, например, эмульсии типа масло/вода.

[000129] В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция может доставляться в виде микроинкапсулирующего устройства, с тем чтобы снизить или предупредить иммунный ответ у хозяина на композицию. Связывающиеся средства, такие как антитела или фрагменты антитела по настоящему изобретению, также могут доставляться в виде микроинкапсулированных в мембране, такой как, например, липосома или другое инкапсулированное или защищенное от воздействия иммунной системой средство доставки.

[000130] В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть в форме стерильного инъекционного препарата, например, стерильной инъекционной водной или масляной суспензии. Эта суспензия может быть составлена в соответствии с методиками, известными из уровня техники, с применением подходящих диспергирующих, смачивающих и суспендирующих веществ.

[000131] В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция может доставляться перорально, местно или внутривенно. В случае системного введения терапевтическая композиция должна быть стерильной, фактически апирогенной и в приемлемом для парентерального введения растворе с надлежащими рН, изотоничностью и стабильностью. Например, фармацевтический препарат фактически не содержит пирогенных веществ, с тем чтобы подходить для введения в качестве терапевтического средства для человека. Эти условия известны специалистам в данной области техники.

[000132] В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения для перорального введения фармацевтическую композицию составляют в форме подходящей капсулы, таблетки, водной суспензии или раствора. Твердые составы на основе композиций для перорального введения могут содержать подходящие носители или наполнители, такие как кукурузный крахмал, желатин, лактоза, аравийская камедь, сахароза, микрокристаллическая целлюлоза, каолин, манит, фосфат

дикальция, карбонат кальция, хлорид натрия или альгиновая кислота. Разрыхлители, которые можно использовать, включают без ограничения микрокристаллическую целлюлозу, кукурузный крахмал, крахмалгликолят натрия и альгиновую кислоту. Связующие вещества для таблеток, которые можно использовать, включают аравийскую камедь, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, поливинилпирролидон (Povidone™), гидроксипропилметилцеллюлозу, сахарозу, крахмал и этилцеллюлозу. Смазывающие вещества, которые можно использовать, включают стеарат магния, стеариновую кислоту, кремнийорганическую жидкость, тальк, воски, масла и коллоидный диоксид кремния.

[000133] В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения для местных применений фармацевтические композиции могут быть составлены в форме подходящей мази. Некоторые примеры составов на основе композиции для местного применения включают капли, настойки, лосьоны, кремы, растворы и мази, содержащие активный ингредиент и различные вспомогательные средства и среды-носители.

[000134] В одном варианте осуществления настоящего изобретения состав в виде полужидкой мази для местного применения, как правило, содержит активный ингредиент в концентрации от приблизительно 1 до 20%, например, от 5 до 10%, в носителе, таком как фармацевтическая основа для крема.

[000135] В одном варианте осуществления настоящего изобретения также можно легко получить фармацевтические композиции для ингаляции и трансдермальные композиции. Терапевтическую композицию можно вводить через нос или легкое, например, в виде жидкого или порошкообразного аэрозоля (лиофилизированного).

[000136] В одном варианте осуществления настоящего изобретения жидкие составы на основе фармацевтической композиции для перорального введения получают в воде или других водных средах-носителях, при этом они могут содержать различные суспендирующие вещества, такие как метилцеллюлоза, альгинаты, трагакант, пектин, кельгин, каррагенан, аравийская камедь,

поливинилпирролидон и поливиниловый спирт. Жидкие составы на основе фармацевтических композиций по настоящему изобретению также могут предусматривать растворы, эмульсии, сиропы и крепкие настои, содержащие наряду с активным соединением (активными соединениями) смачивающие вещества, подсластители, а также красители и ароматизаторы. Различные жидкие и порошкообразные составы на основе фармацевтических композиций можно получить традиционными способами для обеспечения их попадания при ингаляции в легкие млекопитающего, подлежащего лечению.

**[000137]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения жидкие составы на основе фармацевтической композиции для инъекции могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилацетамид, диметилформаимид, сложный этиловый эфир молочной кислоты, сложный этиловый эфир угольной кислоты, изопропилмиристит, этанол, полиолы, т. е. глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п. В некоторых вариантах осуществления композиция включает носитель на основе цитрата/сахарозы/Tween. В случае внутривенных инъекций водорастворимые версии композиций можно вводить капельным способом, при котором вливают фармацевтический состав, содержащий противогрибковое средство и физиологически приемлемый наполнитель. Физиологически приемлемые наполнители могут включать, например, 5% раствор декстрозы, 0,9% солевой раствор, раствор Рингера или другие подходящие наполнители. Подходящую нерастворимую форму композиции можно получить и вводить в виде суспензии на водной основе или фармацевтически приемлемой масляной основе, такой как сложный эфир длинноцепочной жирной кислоты, например, этилолеат.

**[000138]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело к CD154 по настоящему изобретению в количестве от приблизительно 0,1 до 90% по весу (как, например, от 1 до 20% или от 1 до 10%) в фармацевтически приемлемом носителе.

**[000139]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения оптимальное процентное содержание антитела к CD154 по настоящему изобретению в каждой фармацевтической композиции

варьирует в зависимости от самого состава и требуемого терапевтического эффекта при конкретных патологиях и взаимосвязанных терапевтических режимах. Фармацевтические составы хорошо описаны в уровне техники. Традиционные способы, известные рядовым специалистам в области медицины, можно применять для введения фармацевтической композиции субъекту.

**[000140]** Соответственно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению относятся к составам с замедленным высвобождением. Замедленное высвобождение, или контролируемое высвобождение, или медленное высвобождение относятся к составам на основе лекарственного средства, которые высвобождают активное лекарственное средство, такое как лекарственное средство на основе полипептида или антитела, в течение некоторого периода времени после введения субъекту. Замедленное высвобождение лекарственных средств на основе полипептида, которое может происходить в пределах требуемых промежутков времени (например, минуты, часы, дни, недели или дольше в зависимости от состава лекарственного средства), отличается от стандартных составов, в которых фактически вся дозированная единица доступна для немедленного поглощения или немедленного распространения с кровотоком. В определенных вариантах осуществления составы с замедленным высвобождением за одно введение могут обеспечивать такой уровень лекарственного средства в кровотоке, который сохраняется, например, в течение 8 часов или дольше, 12 часов или дольше, 24 часов или дольше, 36 часов или дольше, 48 часов или дольше, 60 часов или дольше, 72 часов или дольше, 84 часов или дольше, 96 часов или дольше, или даже, например, в течение 1 недели или 2 недель или дольше, например, 1 месяца или дольше. Составы с замедленным высвобождением могут содержать антитело к CD154 по настоящему изобретению.

**[000141]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит другое иммуносупрессивное или иммуномодулирующее соединение. Например, такое иммуносупрессивное или иммуномодулирующее соединение может представлять собой одно из следующих: средство, которое прерывает костимулируемую Т-клетками передачу сигнала

через CD28; средство, которое прерывает передачу сигнала кальциеврином, кортикостероид, антипролиферативное средство и антитело, которое специфически связывается с белком, экспрессируемым на поверхности иммунных клеток, в том числе без ограничения CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 и RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT $\beta$  и VLA-4.

[000142] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуносупрессивное или иммуномодулирующее соединение представляет собой такролимус, сиролимус, мофетила микофенолат или его активную форму - микофеноловую кислоту, мизорибин, дезоксиспергуалин, бреквинар натрия, лефлуномид, рапамицин или азаспиран.

[000143] В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитела по настоящему изобретению или фармацевтические композиции, содержащие их, могут содержаться в контейнере, упаковке или дозирующем устройстве отдельно или в виде части набора с этикетками и инструкциями касательно введения.

#### ***Пути введения и доставки***

[000144] Антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту любым способом, который является приемлемым с медицинской точки зрения. Для целей настоящего изобретения "введение" означает любой из стандартных способов введения антитела, фрагмента антитела или фармацевтической композиции, известных специалистам в данной области техники, и не должно ограничиваться примерами, приведенными в данном документе.

[000145] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью инъекции внутривенно, подкожно, внутривентрикулярно, интравентрикулярно, интраваскулярно, интратернально, интраабдоминально, интраартериально, интраэпидурально, интраартикулярно, интратекально, интрапеченочно,

внутрипозвоночно, внутрь опухоли, интракраниально; энтеральным, внутрилегочным, чрезслизистым, внутриматочным или сублингвальным путями введения или местно, например, в участки воспаления или роста опухоли.

[000146] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту перорально или назально, или с помощью ингаляции, глазным, ректальным или местным путями.

[000147] В более конкретном варианте осуществления антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту перорально в форме капсул, таблеток, водных суспензий или растворов.

[000148] В более конкретном варианте осуществления антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту местно путем нанесения крема, мази или т. п.

[000149] В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно вводить с помощью ингаляции посредством применения небулайзера, порошкового ингалятора или дозирующего ингалятора.

[000150] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью введения форм с замедленным высвобождением, такими способами, как инъекции депо-препаратов, или с помощью эродируемых имплантатов, непосредственно внесенных в ходе хирургического вмешательства, или с помощью имплантации субъекту инфузионного насоса или биологически совместимого имплантата с замедленным высвобождением.

[000151] В более конкретном варианте осуществления антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту путем введения инъекционных депо-препаратов, как, например, с использованием

депо-препаратов, которые инъецируют каждые 1, 3 или 6 месяцев, или биоразлагаемых материалов и способов.

[000152] В более конкретном варианте осуществления антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту путем нанесения на кожу субъекта трансдермального пластыря, содержащего антитело, производное антитела или фармацевтическую композицию, при этом оставляя пластырь контактировать с кожей субъекта обычно в течение 1-5 часов из расчета на один пластырь.

[000153] В других вариантах осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в любой дозе в пересчете на вес тела и с любой частотой введения дозы, которые являются приемлемыми с медицинской точки зрения. Приемлемая доза включает диапазон от приблизительно 0,01 до 200 мг/кг веса тела субъекта.

[000154] Рассматриваемые антитела к CD154 вводят субъекту в количестве, эффективном, чтобы вызвать требуемый эффект в отношении иммунитета, т. е. подавление Т- или В-клеточного иммунитета, или количестве, эффективном для предупреждения, лечения или ослабления симптомов заболевания, при котором подавление В- или Т-клеточного иммунитета требуется с терапевтической точки зрения. Как упоминалось, эти состояния включают, в частности, показания аутоиммунного, воспалительного и аллергического характера.

[000155] Общая вводимая доза антитела альтернативно может включать 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 мг или больше или может включать любое количество, лежащее в промежутке между вышеуказанными значениями в мг. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD154, описанные в данном документе, или их связывающие фрагменты, а также комбинации указанных фрагментов антитела можно вводить субъекту-реципиенту с частотой один раз в двадцать шесть недель или меньше, как, например, один раз в шестнадцать недель или меньше, один раз в восемь недель или меньше или один раз в четыре недели, ежемесячно, один раз в две недели или меньше.

**[000156]** В любом из способов применения антител или фармацевтических композиций по настоящему изобретению антитела или фармацевтические композиции можно вводить субъекту в однократной или многократных дозах ежедневно, каждые 2, 3, 4, 5 или 6 дней, еженедельно, ежемесячно или любой период, дробный или кратный этому, и дополнительно можно вводить субъекту повторно с интервалами в диапазоне от одного раза в день до одного раза в два месяца, что определяется квалифицированным специалистом.

**[000157]** В любом из способов применения антител или фармацевтических композиций по настоящему изобретению антитела или фармацевтические композиции, содержащие их, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, с интервалами такой длительности, как показано с медицинской точки зрения, в диапазоне от нескольких дней или недель до целой жизни субъекта. В дополнительных вариантах осуществления антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту повторно с интервалами в диапазоне от одного раза в день до одного раза в два месяца.

**[000158]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в многократных дозах в день, если это необходимо, с достижением общей требуемой суточной дозы. Эффективность способа лечения можно оценивать путем контроля наличия у субъекта известных признаков или симптомов заболевания.

**[000159]** Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения дозировка и уровень дозы антител к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтических композиций по настоящему изобретению, эффективные для получения требуемых эффектов, будут зависеть от ряда факторов, таких как характер заболевания, подлежащего лечению, метрических данных и возраста субъекта, цели лечения, конкретной применяемой фармацевтической композиции, фармакокинетики активного средства и решения лечащего врача.

**[000160]** Следует понимать, что эффективная дозировка может зависеть от отличительных признаков субъекта-реципиента, таких как, например, возраст, пол, наличие беременности, индекс массы тела, безжировая масса тела, состояние или состояния, против которых дается композиция, другие состояния здоровья субъекта-реципиента, которые могут влиять на биотрансформацию композиции или толерантность к ней, уровни IL-6 у субъекта-реципиента и наличие резистентности к композиции (например, возникающей у пациента, у которого вырабатываются антитела к композиции). Специалист в данной области техники сможет определить эффективную дозировку и частоту введения посредством проведения обычных экспериментов, например, руководствуясь раскрытием данного документа и идеями, изложенными в Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; и Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins.

**[000161]** Соответственно, антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению будут вводиться в количестве, эффективном для достижения намеченной для них цели. Терапевтически эффективное количество может обозначать количество антитела, эффективное для предупреждения, уменьшения интенсивности или ослабления симптомов заболевания или продления выживания субъекта, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество может быть достигнуто путем изменения дозы или схемы дозирования вводимых рассматриваемых антител.

**[000162]** Антитела к CD154 по настоящему изобретению и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы для определенных показаний, таких как предупреждение иммунного ответа на антиген, к которому организм субъекта подвергается в течение короткого времени,

такой как экзогенный антиген, который вводят в первый день лечения. Примеры такой терапии будут включать совместное введение фрагмента антитела по настоящему изобретению вместе с терапевтическим средством, например, фармацевтическим препаратом на основе антигена, аллергеном, или препаратом крови, или вектором для генной терапии. При показаниях, когда антиген присутствует длительное время, таких как при контроле иммунной реакции на трансплантированную ткань или в ответ на длительное введение фармацевтических препаратов антигенной природы, фрагменты антитела или фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят с интервалами такой длительности, как показано с медицинской точки зрения, в диапазоне от нескольких дней или недель до целой жизни субъекта.

**[000163]** В любом из способов, описанных в данном документе, антитела или фармацевтические композиции можно вводить субъекту со вторым средством. В определенных вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое средство, такое как, например, иммуномодулирующее или иммуносупрессирующее средство. Иммуномодулирующее или иммуносупрессирующее средство может представлять собой любое из следующих:

(a) средство, которое прерывает костимулируемую Т-клетками передачу сигнала через CD28;

(b) средство, которое прерывает передачу сигнала кальциневрином,

(c) кортикостероид,

(d) антипролиферативное средство и

(e) антитело, которое специфически связывается с белком, экспрессируемым на поверхности иммунных клеток, в том числе без ограничения CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 и RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT $\beta$  и VLA-4.

**[000164]** Иммуносупрессирующее или иммуномодулирующее соединение может представлять собой, например, такролимус, сиролимус, мофетила микофенолат, мизорибин, дезоксиспергуалин, бреквинар натрия, лефлуномид, рапамицин или азаспиран. Антитело и второе средство можно вводить одновременно или

последовательно. В некоторых примерах преимущественным может быть введение одной или нескольких нуклеиновых кислот по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Терапевтические и диагностические способы по настоящему изобретению, включающие стадию введения по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в соответствии с хорошо известными способами, включены в объем настоящего изобретения.

[000165] В одном варианте осуществления настоящего изобретения субъектом(субъектами), которого(которых) можно лечить с помощью вышеописанных способов, является животное. Предпочтительно, животное является млекопитающим. Примеры млекопитающих, которых можно лечить, включают без ограничения людей, отличных от человека приматов, грызунов (в том числе крыс, мышей, хомячков и морских свинок), коров, коней, овец, коз, свиней, собак и кошек. Предпочтительно, млекопитающим является человек.

[000166] Настоящее изобретение можно лучше понять с учетом нижеследующих примеров. Однако специалист в данной области с легкостью поймет, что конкретные обсуждаемые способы и результаты являются лишь иллюстративными для настоящего изобретения, описанного в данном документе.

[000167] Следующие примеры изложены для того, чтобы обеспечить рядовых специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять рассматриваемое изобретение, и они не предполагают ограничение объема того, что рассматривается в качестве настоящего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры, концентраций и т. п.), однако могут допускаться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

#### ПРИМЕРЫ

**ПРИМЕР 1.** Разработка вариантов антитела с более высокой аффинностью к CD154 человека (более низкими значениями  $K_D$ )

[000168] В настоящей заявке авторы настоящего изобретения описывают новое гуманизированное IgG1-антитело к CD154 человека, имеющее последовательности, представленные на **фигурах 1А-С**, которые предназначены для применения в терапии у человека, в частности терапевтических показаний, при которых подавление Т- и В-клеточного иммунитета требуется с терапевтической точки зрения. Как изложено выше, это антитело получали из IDEC131 с помощью комплексного применения способов созревания аффинности и мутагенеза и с помощью модификации Fc-области IgG1 IDEC-131 с целью устранения связывания FcγRII и FcγRIII и C1q (связывания системы комплемента).

[000169] В частности, различные комбинации остатков CDR в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепей IDEC131 подвергали мутации с целью получения варианта IDEC-131, обладающего улучшенной аффинностью связывания с CD154 человека. В результате этих экспериментов получали большое число вариантов. Подавляющее число этих вариантов не связывалось с CD154 человека лучше, чем IDEC-131, вместо этого они характеризовались такими же или худшими значениями аффинности связывания с CD154 человека (результаты не показаны).

[000170] В результате этих экспериментов получали 11 гуманизированных вариантов, которые идентифицировали и которые содержали последовательности переменной области легкой и тяжелой цепей, показанные на **фигурах 2А-2С** и **3**. Затем аффинность связывания с CD154 человека для каждого из этих вариантов оценивали путем скрининга с помощью Biacore. Анализ на Biacore проводили, как показано ниже.

#### АНАЛИЗ НА BIACORE

**Оборудование:** Biacore 3000.

**Буфер для анализа** - 10 нМ буфер HEPES (pH 7,4), 150 нМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% P20 (полиоксиэтиленсорбитана).

**Буфер для восстановления** - 10 мМ глицин HCl (pH 1,75).

**Буфер для конъюгации** - 10 нМ натрий-ацетатный буфер (pH 5).

**Расход** - расход для захвата лиганда составлял 5 мкл/мин. Расход для анализа кинетики составлял 30 мкл/мин.

### **Процедуры**

[000171] Эксперименты по связыванию выполняли на Biacore 300 при 25°C. Антитела непосредственно иммобилизировали на проточной ячейке 2 (1000 RU комбинации № 23) и проточной ячейке 4 (1000 RU EWT № 131) и антиген CD154 пропускали через чип. Связывание антигена с тестируемыми антителами контролировали в режиме реального времени. Из наблюдаемой  $k_{on}$  для каждого варианта определяли  $k_{off}$  и  $K_D$ .

[000172] Оценочный анализ выполняли с использованием конкретных концентраций аналита. При тестируемой концентрации связывание должно наблюдаться даже, если аффинность связывания лиганда является относительно слабой. Полный анализ кинетики можно выполнять с помощью известных способов. Для молекулярных взаимодействий с быстрой скоростью диссоциации стационарную кинетику можно использовать для определения значения  $K_D$ .

[000173] Анализ с использованием критерия хи-квардат ( $\chi^2$ ) можно проводить для определения точности анализа. Значение  $\chi^2$  в пределах 1-2 считается значимым, а ниже 1 считается высокозначимым. В результате этого скрининга было идентифицировано ряд вариантов последовательностей со значительно улучшенными значениями аффинности связывания, т. е. в 4-5 раз превышающими таковые у IDEC-131. Как отмечалось ранее, этот исход был весьма неожиданным, так как IDEC-131 обладает аффинностью связывания или  $K_D$ , составляющей 151 пМ. Этот результат был также удивительным, поскольку IDEC-131 был выбран в качестве основного клинического кандидата среди ряда других кандидатных гуманизированных последовательностей на основании его сильной аффинности связывания с CD154.

[000174] Как показано ниже, получали гуманизированные антитела к CD154, происходящие из IDEC-131, которые характеризовались значениями  $K_D$  в диапазоне от всего лишь 26 пМ до 57 пМ. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей этих вариантов, которые идентифицированы

в настоящей заявке как вариант 21, вариант 22, вариант 23, вариант 24, вариант 25, вариант 26, вариант 27, вариант 28, вариант 29, вариант 30 и вариант 31, представлены на **фигуре 2**.

[000175] В **таблице 4** кратко описаны разные значения аффинности связывания этих вариантов, определенные с помощью Biacore.

**Таблица 4**

Вариант*	$K_a$ (1/мс)	$K_d$ (1/с)	$K_D$	$\chi^2$	Кратность увеличения $K_D$ (по сравнению с IDEC131)
IDEC-131	3,468E +06	5,25E -04	1,51E -10	0,097	1,0
21	4,42E +06	1,28E -04	2,89E -11	0,184	4,7
22	4,48E +06	1,17E -04	2,62E -11	0,222	5,2
23	3,35E +06	1,41E -04	4,21E -11	0,242	4,2
24	3,70E +06	1,35E -04	3,64E -11	0,265	4,9
25	4,11E +06	1,49E +04	3,62E -11	0,243	3,9
26	2,03E +06	1,17 +04	5,76E -11	0,201	2,5
27	3,58E +06	1,20E -04	3,36E -11	0,135	4,5
28	3,65E +06	1,15E -04	3,15E -11	0,108	4,8
29	3,86E +06	1,33E -04	3,44E -11	0,152	4,2
30	4,24E +06	1,40E -04	3,29E -11	0,171	4,4
31	3,61E +06	1,23E -04	3,41E -11	0,121	4,8

(в среднем n=6)

**ПРИМЕР 2.** Применение вариантов антитела с более высокой аффинностью к CD154 человека (более низкими значениями  $K_D$ ) для SC введения

[000176] Как показано в **таблице** выше, вариант № 21, выбранный в качестве основного кандидата, характеризовался значением  $K_D$ , составляющим 29 пМ, который в 4,7 раза превышал таковое у IDEC131. Это улучшение аффинности имеет важное значение, поскольку это должно обеспечивать возможность подкожного введения этого антитела. Предыдущие исследования IDEC131 показали клиническую эффективность у человека при дозе выше 10 мг/кг или для целей анализа верхний предел 20 мг/кг. С учетом этого, и принимая за средний вес индивидуума приблизительно 80 кг, количество, соответствующее эффективной дозе, можно рассчитать следующим образом:

10 мг/кг X 80 кг=800 мг доза.

[000177] Однако доза состава антитела для SC применения обычно не превышает 100 нг/мл

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000895>).

[000178] Более того, объем типичной переносимой дозы для s.q. введения находится в диапазоне от приблизительно 0,5–5 мл (объемы более 3 мл считаются "большими"). Следовательно, для эффективной дозировки IDEC-131 будет требоваться приблизительно 8 мл (см. расчет ниже). Этот объем дозировки значительно превышает медицинские нормы для s.q.

$$(10 \text{ мг/кг} \times 80 \text{ кг}) / 100 \text{ мг/мл} = 8 \text{ мл.}$$

[000179] В отличие от этого, поскольку вариант № 21 (INX021) характеризуется  $K_D$ , которая является в 5 раз меньшей (т. е. связывается с CD154 с большей аффинностью), для варианта будет требоваться в 5 раз меньше лекарственного средства для достижения такой же эффективности. Как показано ниже, это будет приводить к объему дозировки приблизительно 1,6 мл, что согласуется с уровнем общепринятых медицинских норм для s.q. инъекций для пациентов.

$$(2 \text{ мг/кг} \times 80 \text{ кг}) / 100 \text{ мг/мл} = 1,6 \text{ мл.}$$

[000180] Следовательно, в отличие от IDEC131 INX021 должен хорошо подходить для введения s.q. путями.

**ПРИМЕР 3.** Сравнение специфической активности антител к CD154 в соответствии с настоящим изобретением

[000181] На **фигуре 4** схематически изображены результаты экспериментов по обнаружению ингибирования управляемой CD154 Т-клетками активации В-клеток. Эти результаты, представленные на **фигуре**, демонстрируют улучшенную специфическую активность, т. е. более значительное ингибирование управляемой CD154 Т-клетками активации В-клеток у INX-021 по сравнению с IDEC-131.

**ПРИМЕР 4.** Способность антитела по настоящему изобретению вызывать толерантность

[000182] На **фигуре 5** показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что IgG1-антитела к CD154 мыши, содержащие такие же мутации в Fc, как содержатся в INX021 (E269R и K322A), способны индуцировать толерантность в каждой пробе, описанной ранее. Следовательно, антитела к CD154 человека, содержащие эти мутированные константные области IgG1, должны вызывать

толерантность и блокировать другие эффекты CD154 у пациентов-людей.

**ПРИМЕР 6.** INX021 не вызывает агрегацию тромбоцитов *in vitro*  
[000183] На **фигуре 6** показаны результаты экспериментов, которые показывают, что антитело INX021, содержащее мутации, которые снижают или устраняют связывание FcR, не вызывает агрегацию тромбоцитов *in vitro* в анализе с применением иммунных комплексов рассматриваемого антитела INX021 и коллагена. Эти эксперименты *in vitro* показали, что иммунные комплексы мутантов FcR в течение 16 или 20-минутного периода не индуцировали активацию или агрегацию выделенных тромбоцитов мыши либо человека. В отличие от этого, в этом же анализе контрольное антитело 5с8 вызывало агрегацию тромбоцитов.

**ПРИМЕР 7.** Антитела к CD154 в соответствии с настоящим изобретением не вызывают агрегацию тромбоцитов *in vivo*

[000184] На **фигурах 7A-D** показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что INX021 не активировать тромбоциты, не индуцирует агрегацию тромбоцитов и не оказывает влияния (снижения) на число тромбоцитов *in vivo*. Результаты эксперимента на **фигуре 7A** показывают, что INX021 не индуцирует нарушение функции тромбоцитов или активировать тромбоциты по сравнению с положительным контролем. Результаты эксперимента на **фигуре 7B** показывают, что INX021 не оказывает влияния на число циркулирующих тромбоцитов по сравнению с положительным контролем. Результаты эксперимента на **фигуре 7C** показывают, что INX021 не вызывает образование сгустков (эмболов) в легком по сравнению с положительным контролем. На **фигуре 7D** обобщены благоприятные эффекты INX021 *in vivo*, т. е. оно не снижает число тромбоцитов, оно не активировать тромбоциты, оно не вызывает нарушение функции тромбоцитов и оно не индуцирует образование сгустков.

**ПРИМЕР 8.** Применение антител к CD154 в соответствии с настоящим изобретением в моделях аутоиммунных реакций

[000185] Результаты экспериментов, обобщенные на **фигурах 8A-B**, показывают, что гуманизированные IgG1-антитела к CD154, содержащие мутации в Fc INX021, которые снижают или устраняют

связывание FcR, активны в разных моделях аутоиммунных или воспалительных реакций.

[000186] Результаты эксперимента на **фигуре 8А** показывают, что гуманизированные IgG1-антитела к CD154, содержащие мутации в Fc INX021, эффективно подавляют ЕАЕ в течение приблизительно 20-дневного периода. Результаты эксперимента на **фигуре 8В** показывают, что гуманизированные IgG1-антитела к CD154, содержащие мутации в Fc INX021, эффективно подавляют гуморальный иммунный ответ на миелиновый гликопротеин олигодендроцитов ("MOG"), сравнимо с исходным антителом.

**ПРИМЕР 9.** Тестирование вариантов IDEC-131, в том числе INX021, в отношении их способности подавлять индуцируемую Т-клетками активацию В-клеток

[000187] Результаты эксперимента на **фигуре 9** сравнивают эффекты разных вариантов антитела в соответствии с настоящим изобретением, т. е. вариантов № 21 - № 31 (INX021), к подавлению индуцируемой Т-клетками активации В-клеток на основании экспрессии CD86. В этих экспериментах эффекты вариантов антитела в соответствии с настоящим изобретением в отношении подавления сравнивали в реакции смешанных лимфоцитов. Считываемым показателем была экспрессия CD86 активированными В-клетками. Как показано на **фигуре**, антитела с более высокими значениями  $K_D$  не обязательно коррелируют с улучшенным функциональным эффектом в реакциях MLR. INX021 обладал превосходными иммуносупрессивными свойствами по сравнению с другими вариантами.

**ПРИМЕР 10.** Токсикологическое исследование INX021 и измерения Т-клеточно-зависимого иммунного ответа (TDAR)

[000188] Для того, чтобы оценить пригодность для применения в терапии у человека антитело INX021 по настоящему изобретению изучали в токсикологическом исследовании за рамками GLP длительностью 8 недель на макаках-резусах в CRL и лабораториях Гарварда. Схема исследования показана в таблицах ниже. Целями исследования была оценка безопасности и эффективности INX021 у отличного от человека примата (NHP).

**Таблица 5.** Обзор эксперимента TDAR

Обзор эксперимента TDAR

Начало введения доз	День 1
1-ая доза КЛН	День 29
Забор образцов крови	Дни 29, 36, 39 (дни 0, 7, 10 после введения дозы КЛН)
2-ая доза КЛН	День 43
Забор образцов крови	Дни 43, 50, 53, 57 (дни 14, 21, 24, 28 после введения дозы КЛН)
Измерения IgG и IgM	

**Таблица 6.** Группы NHP в исследовании TDAR

Центр	Обработка	N	Виды NHP
CRL	Среда-носитель	4	Резус
CRL	50 мг/кг INX021	8	Резус
CRL	20 мг/кг 5C8	8	Резус
Гарвард	Среда-носитель	3	Яванский
Гарвард	1 мг/кг INX021	3	Яванский
Гарвард	5 мг/кг INX021	3	Яванский

[000189] На **фигурах 10А-В** сравниваются эффекты INX021 и химерного антитела 5с8 на продуцирование IgG- и IgM-антител в анализе КЛН. На **фигуре 10А** сравниваются их эффекты в отношении IgG, и на **фигуре 10В** сравниваются их эффекты в отношении IgM.

[000190] На **фигурах 11А-В** сравниваются эффекты среды-носителя, INX021 и антитела 5с8 на баллы оценки зародышевых центров. На **фигуре 11А** показано сравнение баллов оценки зародышевых центров, и на **фигуре 11В** представлены гистограммы, сравнивающие число зародышевых центров и степень их насыщенности клетками в селезенках и лимфатических узлах (LN) обработанных животных.

[000191] На **фигуре 12** кратко описана наблюдаемая частота возникновения очагов поражения по сравнению с опубликованными результатами по другому антителу к CD154 (пегилированному Fab  $\alpha$ CD154 от Biogen/UCB).

[000192] Эти результаты указывают, что INX021 должен быть безопасным и эффективным в терапии у человека.

**ПРИМЕР 11. INX021 подавляет образование антител к лекарственному средству (ADA) у NHP**

[000193] В течении экспериментов по изучению токсичности/TDAR INX021, обсуждаемых в предыдущем примере, авторы настоящего изобретения определяли наличие ADA во всех когортах. TDAR-ответы у всех животных подавлялись, что свидетельствует о том, что образование антител в ответ на

растворимые антигены может быть предотвращено у животных, обработанных INX021. Для изучения этого авторы настоящего изобретения определяли образование ADA у макаков-резусов после 8-недельного инъектирования INX021 или 5C8. У всех, кроме одного животного, из группы INX021 при наиболее низких дозах (1 мг/кг) не наблюдали никаких обнаруживаемых ADA.

### **Способы**

*Обнаружение антител к INX021 и ch5C8 у макаков-резусов (ELISA)*

*Получение 2 н. серной кислоты (останавливающий раствор)*

[000194] Для каждых 1000 мл получаемой 2 н. серной кислоты объединяли 500 мл 4 н. серной кислоты с 500 мл дистиллированной воды. Хорошо перемешивали. Для каждого отдельного компонента будет устанавливаться срок хранения, составляющий один год от даты получения, или срок хранения согласно производителю, в зависимости от того, что наступит раньше. Растворы будут храниться при комнатной температуре (17°C - 27°C).

### **Получение покрытых 96-луночных планшетов**

[000195] В этих протоколах тестируемый материал обозначает образцы, содержащие сыворотку крови макаков-резусов или яванских макаков, образцы, содержащие положительный контроль, и/или холостые пробы.

#### *Протокол*

1. Получают раствор для покрытия с концентрацией INX021 или ch5C8 1,0 пг/мл с использованием буфера для покрытия (0,2 карбонатно-бикарбонатного буфера) в качестве разбавителя.

2. Добавляют 100 пл раствора для покрытия в каждую лунку прозрачного 96-луночного полистирольного планшета (планшетов) и закрывают.

3. Инкубируют планшет(планшеты) в течение 12-24 часов при 2°C - 8°C.

4. Аспирируют (удаляют) раствор для покрытия из каждой лунки планшета (планшетов), затем промывают каждую лунку с помощью 3×300 пл 1X PBS-T.

5. Добавляют 200 пл блокирующего раствора казеина в каждую лунку планшета (планшетов) и закрывают.

6. Инкубируют планшет в течение 1 часа  $\pm$  5 минут.

7. Аспирируют блокирующий раствор казеина из каждой лунки планшета (планшетов), затем промывают каждую лунку с помощью 3x300 пл 1X PBS-T.

8. Используют планшет (планшеты) сразу же после промывания (завершают добавление в планшеты в течение 2 часов после завершения промывания). Устанавливают срок хранения от даты, когда была завершена подготовка планшета.

#### **Процедура анализа обнаружения антител к INX021 или ch5C8**

[000196] В этих экспериментальных протоколах "тестируемый материал" обозначает образцы, содержащие сыворотку крови макаков-резусов или яванских макаков, образцы, содержащие положительный контроль, и/или холостые пробы. Комнатная температура/температура окружающей среды составляет 17°C - 27°C.

#### Протокол

1. Добавляют 100 пл каждого тестируемого материала в соответствующую (соответствующие) лунку (лунки) планшета (планшетов), покрытого (покрытых) INX021 или ch5C8 и закрывают с помощью устройства для герметизации планшетов.

2. Используют шаблон планшета для регистрации расположения тестируемого материала.

3. Инкубируют тестируемый материал в планшете (планшетах), покрытом (покрытых) INX021 или ch5C8, при комнатной температуре в течение 1 часа  $\pm$  5 минут.

#### Процедура анализа

1. Аспирируют тестируемый материал из каждой лунки планшета (планшетов), затем промывают каждую лунку планшета (планшетов) с помощью 3x300 пл 1X PBS-T.

2. Добавляют 100 пл 0,125 пг/мл INX021-биотин или 1,0 пг/мл ch5C8-биотин в каждую лунку планшета (планшетов) и закрывают с помощью устройства для герметизации планшетов.

3. Инкубируют планшет (планшеты) при комнатной температуре в течение 1 часа  $\pm$  5 минут.

4. Аспирируют (удаляют) INX021-биотин или ch5C8-биотин из каждой лунки планшета (планшетов), затем промывают каждую лунку планшета (планшетов) с помощью 3×300 пл 1X PBS-T.

5. Добавляют 100 пл 0,1 пг/мл SA-HRP в каждую лунку планшета (планшетов) и закрывают.

6. Инкубируют планшет (планшеты) при комнатной температуре в течение 30 минут ± 5 минут.

7. Аспирируют (удаляют) SA-HRP из каждой лунки планшета (планшетов), затем промывают каждую лунку планшета (планшетов) с помощью 3×300 пл 1X PBS-T.

8. Добавляют 100 пл TMB в каждую лунку планшета (планшетов).

9. Инкубируют планшет (планшеты) при комнатной температуре в течение 20 минут ± 5 минут.

10. Добавляют 100 пл 2 н. серной кислоты в каждую лунку планшета (планшетов).

11. Считывают планшет (планшеты) при 450 нм с применением микропланшетного спектрофотометра с анализом в течение 30 минут.

#### Общая обработка данных

[000197] Для всех тестируемых материалов будут рассчитывать среднее значение A450, стандартное отклонение и % различие (если n=2) или CV% (если n>3), чтобы оценить дисперсию, если не определено иное. Все критерии приемлемости CV% будут применяться к % значениям различия, если % различие рассчитывается вместо CV%. Если анализируют три или более лунок с тестируемым материалом одну лунку можно не учитывать, если CV% не соответствует указанным критериям.

% CV:  $r$  стандартное отклонение  $>$  среднее значение  $\times 100$

% различия:  $r$  значение A - значение B  $\div$  среднее значение  $\times 100$

[000198] Анализ максимальных нормированных остатков (MNR) будут выполнять для оценки дисперсии при 5% уровне с учетом холостого TS для отбрасывания не более чем двух выпадающих значений A450 холостых тестируемых образцов (TS). Среднее значение A450 будет рассчитываться из всех значений, не

отброшенных в качестве выпадающих значений. Дополнительные лунки можно не учитывать из-за технической ошибки.

**[000199]** Порог отсеечения для конкретного планшета (PSCP) будет рассчитываться в виде: общий порог отсеечения (CP)  $\times$  среднее значение A450 холостого TS (без выпадающих значений) = PSCP.

Общие критерии приемлемости

**[000200]** Если холостой TS имеет более двух выпадающих значений, то планшет не дает результатов, и его следует повторно анализировать. По меньшей мере 5 значений A450 холостого TS должны остаться для анализа MNR после скрывания выпадающих значений и значений от лунок, которые были скрыты из-за технической ошибки. Следующее уравнение будет применяться для расчета значения MNR: значение MNR холостого TS - среднее значение холостого TS.

Стандартное отклонение  $\times Vn-1$

**[000201]** Значение будет определено как выпадающее, если значение MNR превышает критическое значение. Критические значения определяются как:  $n=12=0,727$ ,  $n=11=0,745$ ,  $n=10=0,763$ ,  $n=9=0,783$ ,  $n=8=0,804$ ,  $n=7=0,825$ ,  $n=6=0,844$  и  $n=5=0,858$ . Все выпадающие значения будут скрываться.

**[000202]** Среднее значение A450 холостой пробы, представляющей собой блокирующий раствор казеина, и холостого TS после отбрасывания выпадающих значений должно быть меньше, чем LPC A«0. Порог отсеечения для конкретного планшета (PSCP) будет рассчитываться в виде:  $PSCP=CF * \text{общее среднее значение холостого TS (без выпадающих значений)}$ . Поправочный коэффициент (CF) будет добавляться к файлу исследования. Среднее значение A450 LPC должно превышать PSCP. В противном случае LPC для данного набора не дает результатов.

**[000203]** CV% холостой пробы, представляющей собой буфер для анализа, должен составлять <30%. Если холостая проба, представляющая собой буфер для анализа, не соответствует критериям, перечисленным выше, то планшет будет оцениваться в ходе научного обзора для определения того, можно ли использовать данные.

[000204] НРС>МРС>ЛРС для среднего значения A450 каждого набора РС. По меньшей мере две-третьих уровней РС должны соответствовать критериям приемлемости, при этом по меньшей мере один РС на каждом уровне РС должен соответствовать критериям приемлемости.

[000205] % различие тестируемых образцов между параллельными лунками должно составлять <25%. Если тестируемый образец не соответствует этим критериям, то образец будут повторно анализировать.

*Получение положительных контролей, холостых TS и холостой пробы, представляющей собой буфер для анализа*

[000206] Положительные контроли будут получать путем внесения суррогатного антитела в качестве положительного контроля в 100% сыворотку крови макака-резуса (RHS) или сыворотку крови яванского макака. Положительные контроли в 100% матрице будут разводить в 10 раз блокирующим раствором казеина с получением соответствующей рабочей концентрации и 10% матрицы. Каждый набор РС будут получать независимо друг от друга и будут анализировать на каждом планшете. В день анализа РС будут анализировать на каждом планшете.

[000207] Каждый планшет будет содержать два набора РС ЛРС (50 нг/мл), МРС (250 нг/мл) и НРС (1000 нг/мл). Холостой TS также будут получать в конечной концентрации 10% матрицы, разведенной блокирующим раствором казеина. 12 лунок холостого TS будет включено на каждом планшете. Блокирующий раствор казеина будет включен по меньшей мере в две лунки на каждом планшете. Весь тестируемый материал будут анализировать минимум в двух лунках, если не определено иное.

#### *Анализ скрининга*

[000208] Для скрининга образцы разводили 1/10 в блокирующем растворе казеина и анализировали согласно процедуре, описанной в разделе 7.0. Среднее значение поглощения исследуемых образцов в ходе анализа образцов будут сравнивать с PSCP и будут представлять в качестве потенциально положительного, если среднее значение поглощения составляет >PSCP, или

отрицательного, если среднее значение поглощения составляет <PSCP.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

[000209] TDAR-ответы у всех животных подавлялись, что свидетельствует о том, что образование антител в ответ на растворимые антигены может быть предотвращено у животных, обработанных INX021. Для изучения этого авторы настоящего изобретения определяли образование ADA у макаков-резусов после 8-недельного инъецирования INX021 или 5C8. У всех, кроме одного животного, из группы INX021 при наиболее низких дозах (1 мг/кг) не наблюдали никаких обнаруживаемых ADA. Следовательно, антитело INX021 по настоящему изобретению можно применять для подавления гуморальных иммунных реакций, например, в ответ на иммуногенные лекарственные средства, такие как биологические препараты, например, терапевтические антитела, слитые белки и т. п.

### ССЫЛКИ, ЦИТИРУЕМЫЕ В НАСТОЯЩЕЙ ЗАЯВКЕ

Цитируются следующие ссылки. Содержание всех включено в данный документ посредством ссылки.

1. Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. и Burns, C., CD40 and its ligand in autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1997. 815: 384-391.

2. Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. и Noelle, R. J., The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. J Leukoc Biol 1998. 63: 418-428.

3. Noelle, R. J., CD40 and its ligand in cell-mediated immunity. Agents Actions Suppl 1998. 49: 17-22.

4. Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. и Noelle, R. J., CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. Annu Rev Immunol 2004. 22: 307-328.

5. Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. и Ricordi, C., Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. Proc Natl Acad Sci U S A 1999. 96: 8132-8137.

6. Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D. K., TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. и Harlan, D. M., Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999. 5: 686-693.

7. Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391-397.

8. Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391-397.

9. Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. и Taylor, F. R., The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge. *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594.

10. U.S. Patent No. 6,444,018

11. Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. и Greiner, D. L., Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody. *Diabetes* 1998. 47: 1199-1206.

12. Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. и Rossini, A. A., Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997. 64: 329-335.

13. Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. и Noelle, R. J., CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation* 2003. 76: 1375-1379.

14. Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. и Noelle, R.

J., Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* 2003. 102: 1920-1926.

15. Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. и Wade, W. F., Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice. *J Immunother* 2003. 26: 72-84.

16. Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. и Burns, C., Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. *Arth Rheum.* 2003. в печати.

17. Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. и Kirk, A. D., Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 2001. 72: 1473-1478.

18. Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. и Korsgren, O., Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice. *Cell transplantation* 2002. 11: 715-720.

19. Wekerle, T. и Sykes, M., Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annual review of medicine* 2001. 52: 353-370.

20. Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. и Tremblay, J. P., Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation. *Transplantation* 2002. 73: 453-461.

21. Tung, T. H., Mackinnon, S. E. и Mohanakumar, T., Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model. *Transplantation* 2003. 75: 644-650.

22. Koyama, I., Kawai, T., Andrews, D., Boskovic, S., Nadazdin, O., Wee, S. L., Sogawa, H., Wu, D. L., Smith, R. N., Colvin, R. B., Sachs, D. H. и Cosimi, A. B., Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its

prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* 2004. 77: 460-462.

23. Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. и Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000. 6: 114.

24. Daley, S. R., Cobbold, S. P. и Waldmann, H., Fc-disabled anti-mouse CD40L antibodies retain efficacy in promoting transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2008. 8: 2265-2271.

25. Sanchez-Fueyo, A., Domenig, C., Strom, T. B. и Zheng, X. X., The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression. *Transplantation* 2002. 74: 898-900.

26. Monk, N. J., Hargreaves, R. E., Marsh, J. E., Farrar, C. A., Sacks, S. H., Millrain, M., Simpson, E., Dyson, J. и Jurcevic, S., Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003. 9: 1275-1280.

27. Truscott, S. M., Abate, G., Price, J. D., Kemper, C., Atkinson, J. P. и Hoft, D. F., CD46 engagement on human CD4+ T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses. *Infection and immunity* 2010. 78: 5295-5306.

28. Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J. P., Cope, A., Hayday, A. и Kemper, C., Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature immunology* 2010. 11: 862-871.

29. Fuchs, A., Atkinson, J. P., Fremeaux-Bacchi, V. и Kemper, C., CD46-induced human Treg enhance B-cell responses. *European journal of immunology* 2009. 39: 3097-3109.

30. Alford, S. K., Longmore, G. D., Stenson, W. F. и Kemper, C., CD46-induced immunomodulatory CD4+ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *Journal of immunology* 2008. 181: 2544-2555.

31. Barchet, W., Price, J. D., Cella, M., Colonna, M., MacMillan, S. K., Cobb, J. P., Thompson, P. A., Murphy, K. M., Atkinson, J. P. и Kemper, C., Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood* 2006. 107: 1497-1504.

32. Liszewski, M. K., Kemper, C., Price, J. D. и Atkinson, J. P., Emerging roles and new functions of CD46. *Springer seminars in immunopathology* 2005. 27: 345-358.

33. Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. и Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand [In Process Citation]. *Nat Med* 2000. 6: 114.

34. Langer, F., Ingersoll, S. B., Amirkhosravi, A., Meyer, T., Siddiqui, F. A., Ahmad, S., Walker, J. M., Amaya, M., Desai, H. и Francis, J. L., The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation. *Thrombosis and haemostasis* 2005. 93: 1137-1146.

35. Robles-Carrillo, L., Meyer, T., Hatfield, M., Desai, H., Davila, M., Langer, F., Amaya, M., Garber, E., Francis, J. L., Hsu, Y. M. и Amirkhosravi, A., Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Immunol* 2010. 185: 1577-1583.

36. Couzin, J., Drug discovery. Magnificent obsession. *Science* 2005. 307: 1712-1715.

37. Hessel, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W., Marx, P. A. и Burton, D. R., Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007. 449: 101-104.

38. Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. и Williamson, L. M., Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol* 1999. 29: 2613-2624.

39. Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. и Blazar, B. R., Combined

effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions. *Blood* 2002. 100: 3400-3407.

40. Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. и Aruffo, A., A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. 89: 6550-6554.

41. Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. и Noelle, R. J., Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J Immunol* 2005. 175: 771-779.

42. Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. и Greiner, D. L., Induction of immunological tolerance to islet allografts. *Cell Transplant* 1996. 5: 49-52.

43. Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. и Rossini, A. A., Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1998. 30: 2444-2446.

44. Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. и Rossini, A. A., Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation. *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814-815.

45. van den Eertwegh, A. J., Van Meurs, M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. и Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Adv Exp Med Biol* 1994. 355: 75-80.

46. van, den, Eertwegh, Aj, Van, M. M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. и Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the

spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Advances in experimental medicine and biology* 1994. 355: 75-80.

47. Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E. и Noelle, R. J., gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 157-164.

48. Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Boersma, W. J. и Claassen, E., CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *National Academy of Sciences, Washington, D.c, Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996. 93: 2499-2504.

49. Nagelkerken, L., Haspels, I., van Rijs, W., Blauw, B., Ferrant, J. L., Hess, D. M., Garber, E. A., Taylor, F. R. и Burkly, L. C., FcR interactions do not play a major role in inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by anti-CD154 monoclonal antibodies. *J Immunol* 2004. 173: 993-999.

50. Becher, B., Durell, B. G. и Noelle, R. J., Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002. 110: 493-497.

51. Becher, B., Durell, B. G., Miga, A. V., Hickey, W. F. и Noelle, R. J., The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J Exp Med* 2001. 193: 967-974.

52. Howard, L. M., Miga, A. J., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C., Laman, J. D., Noelle, R. J. и Miller, S. D., Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1999. 103: 281-290.

**[000210]** Полное раскрытие каждого цитируемого документа (в том числе патентов, заявок на патенты, статей из журналов, рефератов, руководств, книг или других раскрытий) в разделах "Уровень техники изобретения", "Подробное описание" и "Примеры"

включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[000211] Эти и другие изменения можно осуществлять по отношению к настоящему изобретению в свете приведенного выше подробного описания. В целом, в следующей формуле изобретения используемые термины не должны ограничивать настоящее изобретение конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения. Следовательно, настоящее изобретение не ограничивается раскрытием, а вместо этого объем настоящего изобретения определяется исключительно следующей формулой изобретения.

[000212] Настоящее изобретение можно осуществлять на практике другими способами, чем конкретно описанные в вышеизложенном описании и примерах. Многочисленные модификации и вариации настоящего изобретения допускаются в свете вышеизложенных идей, и, следовательно, они находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело против CD154 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которое содержит:

(i) полипептид переменной области тяжелой цепи, содержащий полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 15 или 17, и

(ii) полипептид переменной области легкой цепи, содержащий полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31.

2. Антитело против CD154 человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, выбранное из группы, состоящей из:

(i) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:22;

(ii) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:23;

(iii) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:24;

(iv) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:25;

(v) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:26;

(vi) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий

последовательность SEQ ID NO:27;

(vii) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:28;

(viii) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:29;

(ix) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:30; и

(x) антитела, содержащего полипептид переменной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:17, и полипептид переменной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:31.

3. Антитело против CD154 человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее полипептид константной области тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:3; и полипептид константной области легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:4.

4. Антитело против CD154 человека или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, которое содержит по меньшей мере одно из следующего:

(i) константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, лишенные способности связывать C1q или лишенные способности связываться с FcγR2 и/или FcγR3;

(ii) константные области IgG1 человека, лишенные способности связывать C1q и способности связываться с FcRγ2 и/или FcRγ3;

(iii) константные области IgG1 человека, которые содержат мутации E269R и K322A (где нумерация соответствует Kabat);

(iv) полипептиды легкой и тяжелой константной области IgG1, содержащие последовательности SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4;

(v) константные области IgG1, которые содержат по меньшей

мере одну другую мутацию, отличную от мутаций E269R и K322A, которая влияет на способность связывать C1Q и/или способность связываться с FcγR2 и/или FcγR3;

(vi) константные области IgG1, которые содержат по меньшей мере одну мутацию, влияющую на способность связывать C1Q и/или способность связываться с FcγR2 и/или FcγR3, и которые дополнительно содержат по меньшей мере одну другую мутацию, влияющую на эффекторную функцию, отличную от способности связывать C1Q или способность связываться с FcγR2 и/или FcγR3;

(vii) константные области IgG1, которые содержат по меньшей мере одну другую мутацию, влияющую на способность связывать C1Q и/или способность связываться с FcγR2 и/или FcγR3, и которые дополнительно содержат по меньшей мере одну другую мутацию, нарушающую эффекторную функцию, отличную от способности связывать C1Q или способность связываться с FcγR2 и/или FcγR3, выбранными из связывания и гликозилирования FcRn;

(viii) константные области IgG1, содержащие мутацию E233P и/или D265A или содержащие одну или несколько мутаций Fc, выбранных из следующих: E269R, E233P, D265A, D265N, D270N, N297A, S298N, P329A, D270A, K326V, V369R, F405K, L410P, V427R, L234N, G237M, S239F, V262E, V264F, V266T, S267N, N268E, N297R, T299A, R301D, N325L, N325E и L328R (где нумерация соответствует Kabat);

(ix) константные области IgG1, содержащие мутацию E233P (где нумерация соответствует Kabat);

(x) область Fc, которая мутирована для введения одной или нескольких мутаций, улучшающих период полувыведения *in vivo*; или

(xi) антитело против CD154 человека содержит любую комбинацию последовательностей или мутаций, указанных в (i)-(x).

5. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или профилактически эффективное количество по меньшей мере одного гуманизованного анти-CD154 антитела человека по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для иммуносупрессии или иммунотерапии у больного.

7. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для индукции толерантности или длительной антиген-специфической иммуносупрессии у больного.

8. Применение по п.7, где реципиент является реципиентом трансплантата, и лекарственное средство, содержащее анти-CD154 антитело вводят реципиенту трансплантата перед, во время или после трансплантации донорской ткани, органа или клеток, где указанная донорская ткань, орган или клетки необязательно могут быть созданы методами генной инженерии и также, необязательно, могут содержать CAR-T или NK-клетки, и таким образом, каждое введение обеспечивает индукцию толерантности и пролонгированной антигенспецифической иммуносупрессии против трансплантированного донора, ткани, органа или клетки.

9. Применение по п.8, где реципиентом трансплантата, которому вводят лекарственное средство, содержащее анти-CD154 антитело перед, во время или после трансплантации донорской ткани, органа или клеток, является реципиент костного мозга, органа или иммунных клеток, где костный мозг, ткань, орган или иммунные клетки необязательно, содержит Т-клетки донора и/или реципиента, и также необязательно их инкубируют с анти-CD154 антителом по любому из пп.1-4 перед трансплантацией.

10. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения пациента с аллергическим, воспалительным или аутоиммунным нарушением, выбранным из синдрома Шегрена псориаза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, оофорита, волчанки, диабета, болезни Крона, тиреоидита, тяжелой миастении, системной красной волчанки, болезни Грейвса, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, гемолитической анемии, сахарного диабета, воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза, лекарственного аутоиммунного заболевания или лекарственной волчанки.

11. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для индукции толерантности без возникновения тромботических осложнений у больного.

12. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения

лекарственного средства для лечения опосредованного Т-клетками аутоиммунного нарушения, выбранного из синдрома Шегрена, ревматоидного артрита, тяжелой миастении, системной красной волчанки, болезни Грейвса, болезни Гентингтона, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, гемолитической анемии, сахарного диабета, болезни Паркинсона, псориаза, болезни Аддисона, рассеянного склероза, волчанки и лекарственных аутоиммунных заболеваний, например, лекарственной волчанки, при этом указанное применение также необязательно предусматривает применение антигена, против которого индуцируют пролонгированную толерантность или иммуносупрессию.

13. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики GVHD, отторжения костномозгового трансплантата (ВМТ), рассеянного склероза, волчанки, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), ревматоидного артрита, астмы, воспалительного заболевания кишечника (IBD) или другого воспалительного заболевания кишечника у больного.

14. Применение антитела по любому из пп.1-4 для получения лекарственного средства для лечения состояния, нарушения или заболевания у человека, опосредованных в целом или частично передачей сигнала с участием CD40 у больного.

15. Применение по п.14, где состояние, нарушение или заболевание у человека представляют собой воспалительный, аллергический или аутоиммунный ответ или фиброз.

16. Применение по п.14 или п.15, где состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из волчаночного нефрита, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, спондилоартрита, лекарственной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона, псориаза и рассеянного склероза.

17. Применение по п.14, где состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из аллергического контактного дерматита, генерализованной алопеции, геморрагической пурпуры, астмы, тяжелой астмы, метаболической астмы, аллергической астмы, атопического дерматита, герпетиформного дерматита, стойкой

возвышающейся эритемы, кольцевидной эритемы, многоформной эритемы; узловой эритемы, аллергического гранулематоза, кольцевидной гранулемы, гранулоцитопении, гиперчувствительного пневмонита, кератита, нефротического синдрома, перекрестного синдрома, аллергоза голубеводов, идиопатического полиневрита, крапивницы, увеита, ювенильного дерматомиозита и витилиго.

18. Применение по п.14, где состояние, нарушение или заболевание у человека выбраны из аллергического бронхолегочного аспергиллеза, аутоиммунной гемолитической анемии, акантокератодермии, аллергического контактного дерматита, болезни Аддисона, атопического дерматита, гнездной алопеции, генерализованной алопеции, амилоидоза, геморрагической пурпуры, анафилактической реакции, апластической анемии, врожденного ангионевротического отека, идиопатического ангионевротического отека, анкилозирующего спондилоартрита, височного артериита, гигантоклеточного артериита, артериита Такаясу, темпорального артериита, астмы, телеангиэктатической атаксии, аутоиммунного оофорита, аутоиммунного орхита, аутоиммунного полиэндокринного синдрома, болезни Бехчета, болезни Бергера, болезни Бюргера, буллезной пузырчатки, хронического кандидоза кожи и слизистых оболочек, синдрома Каплана, постинфарктного синдрома, посткардиотомного синдрома, кардита, целиакии-спру, болезни Шагаша, синдрома Чедиака-Хигаси, болезни Черджа-Стросса, синдрома Когана, болезни холодových агглютининов, CREST-синдрома, болезни Крона, криоглобулинемии, криптогенного фиброзирующего альвеолита, герпетиформного дерматита, дерматомиозита, сахарного диабета, синдрома Даймонда-Блекфена, синдрома Ди Джорджи, дискоидной красной волчанки, эозинофильного фасциита, эписклерита, стойкой возвышающейся эритемы, кольцевидной эритемы, многоформной эритемы, узловой эритемы, семейной средиземноморской лихорадки, синдрома Фелти, легочного фиброза, геморрагического гломерулонефрита, аутоиммунного гломерулонефрита, постстрептококкового гломерулонефрита, гломерулонефрита, развивающегося после трансплантации, мембранозного гломерулонефрита, синдрома Гудпасчера, реакции "трансплантат против хозяина", иммуноопосредованной

гранулоцитопении, кольцевидной гранулемы, аллергического гранулематоза, гранулематозного миозита, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, гемолитической болезни новорожденных, идиопатического гемохроматоза, пурпуры Геноха-Шенлейна, хронического активного гепатита, хронического прогрессирующего гепатита, гистиоцитоза х, гиперэозинофильного синдрома, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Джоба, ювенильного дерматомиозита, ювенильного ревматоидного артрита (ювенильного хронического артрита), болезни Kawasaki, кератита, сухого кератоконъюнктивита, синдрома Ландри-Гийена-Барре-Штроля, лепроматозной проказы, синдрома Леффлера, синдрома Лайелла, болезни Лайма, лимфоматоидного гранулематоза, системного мастоцитоза, смешанного заболевания соединительной ткани, множественного мононеврита, синдрома Макла-Уэльса, слизисто-кожного лимфодулярного синдрома, слизисто-кожного лимфодулярного синдрома, многоочагового ретикулогистиоцитоза, рассеянного склероза, тяжелой миастении, грибовидного микоза, системного некротического васкулита, нефротического синдрома, перекрестного синдрома, паникулита, пароксизмальной холодной гемоглобинурии, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, пемфигоида, пузырчатки, эритематозной пузырчатки, листовидной пузырчатки, обыкновенной пузырчатки, аллергоза голубеводов, гиперчувствительного пневмонита, узелкового полиартериита, ревматической полимиалгии, полимиозита, идиопатического полиневрита, видов семейной полинейропатии португальского типа, преэклампсии/эклампсии, первичного биллиарного цирроза, прогрессирующего системного склероза (склеродермии), псориаза, псориазического артрита, легочного альвеолярного протеиноза, легочного фиброза, феномена/синдрома Рейно, тиреоидита Риделя, синдрома Рейтера, рецидивирующего полихондрита, острой ревматической лихорадки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склерита, склерозирующего холангита, сывороточной болезни, синдрома Сезари, синдрома Шегрена, синдрома Стивенса-Джонсона, болезни Стилла, подострого склерозирующего панэнцефалита, симпатической офтальмии, системной красной волчанки, отторжения трансплантата, язвенного колита, недифференцированного

заболевания соединительной ткани, хронической крапивницы, холодовой крапивницы, увеита, витилиго, болезни Вебера-Кристиана, гранулематоза Вегенера и синдрома Вискотта-Олдрича.

19. Применение по п.14, где состояние, нарушение или заболевание у человека представляет собой Шегрена.

20. Применение по п.14, где состояние, нарушение или заболевание у человека представляет собой рассеянный склероз.

По доверенности

Фигура 1АТяжелая цепь

Вариабельная область выделена **жирным шрифтом**

CDR выделены желтым цветом

Мутированные остатки, ответственные за созревание аффинности, подчеркнуты

Мутации в Fc (E→R и K→A) выделены красным цветом

```

      10      20      30      40      50      60
EVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSIT NGFWIWIRKP PGNKLEYMGY ISYSGSTYYN

      70      80      90     100     110     120
PSLKSRLSIS RDTSKNQFSL KLSSVTAADT GVVYCAYRSY GRTPYYFDYW GQGTTTLTVSS

     130     140     150     160     170     180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQV HTFPAVLQSS

     190     200     210     220     230     240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKAEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG

     250     260     270     280     290     300
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HSDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

     310     320     330     340     350     360
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCAVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

     370     380     390     400     410     420
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

     430     440     450
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

```

Фигура 1ВЛегкая цепь

Варибельная область выделена **жирным шрифтом**

CDR выделены желтым цветом

Мутированные остатки, ответственные за созревание аффинности, подчеркнуты

```

      10      20      30      40      50      60
DIVMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASSNLG HAWAWYQQKPK GKSPKLLIYS ASNRYTGVPD

      70      80      90     100     110     120
RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFADYFCQQ YDDYPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP

      130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT

      190     200     210
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

```

## Фигура 1С

### Последовательности INX021

#### **Варибельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 1)**

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITNGFWIWIRKPPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRISISR  
DTSKNQFSLKLSVTAADTGVIYCAYSYGRTPYYFDYWGQGTTTLTVSS

#### **Варибельная область легкой цепи (SEQ ID NO: 2)**

DIVMTQSPSFLSASVGDRTITCKASSNLGHAVAWYQQKPKGKPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFADYFCQQYDDYPYTFGGGTKLEIK

#### **Константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 3)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

#### **Константная область легкой цепи (SEQ ID NO: 4)**

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSST  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

#### **CDR1 тяжелой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 5)**

GDSITNGFWI

#### **CDR2 тяжелой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 6)**

YISYSGSTY

#### **CDR3 тяжелой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 7)**

YRSYGRTPYYFDY

#### **CDR1 легкой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 8)**

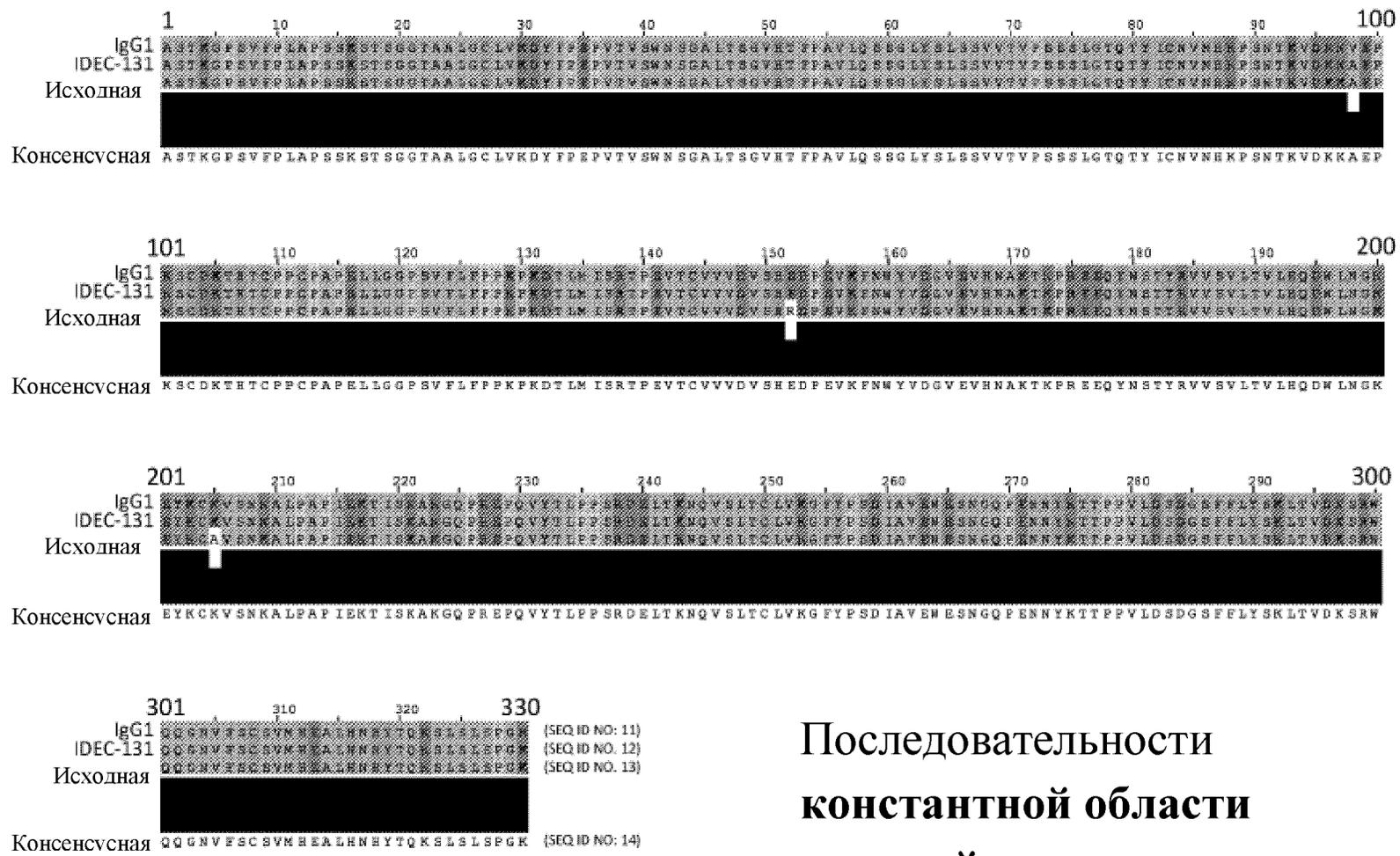
KASSNLGHAVA

#### **CDR2 легкой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 9)**

SASNRYT

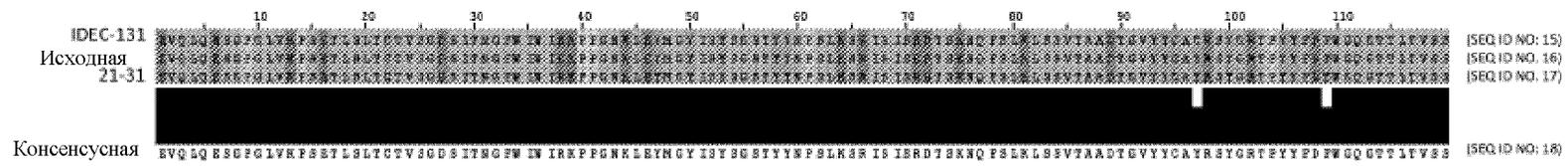
#### **CDR3 легкой цепи, INX021 (SEQ ID NO: 10)**

QQYDDYPYT



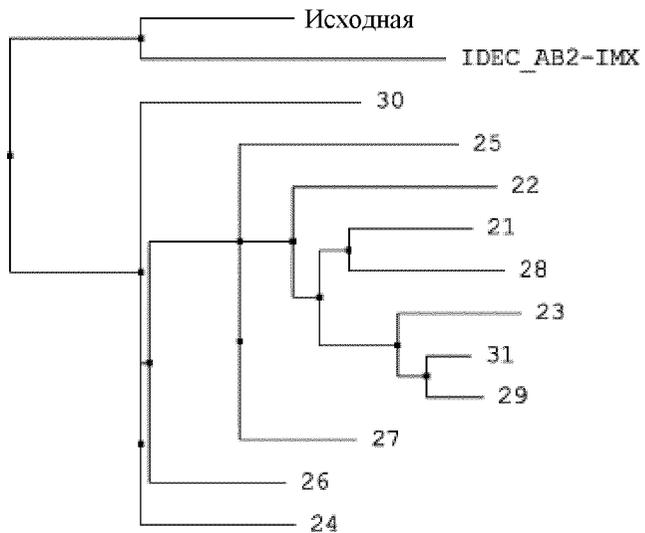
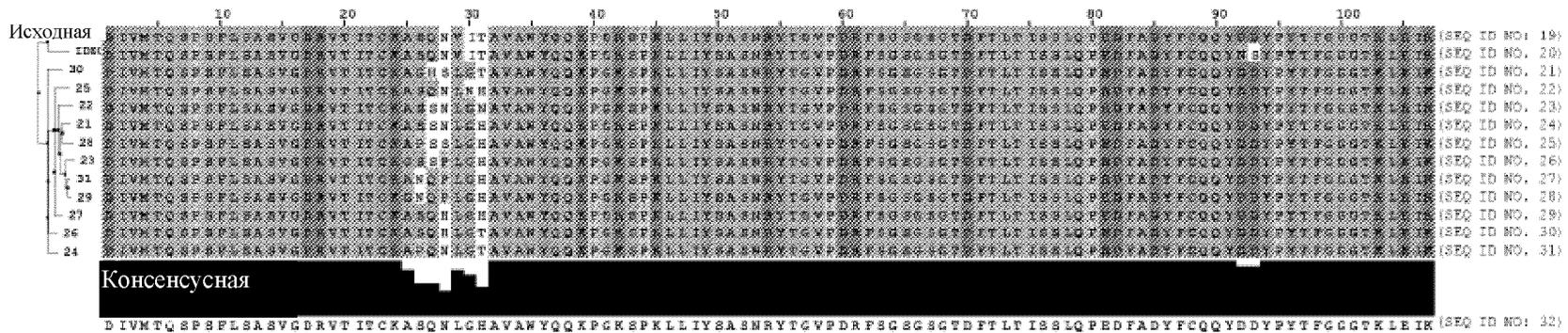
Последовательности  
константной области  
тяжелой цепи

Фигура 2А



Последовательности  
вариабельной  
области тяжелой цепи

Фигура 2В



Последовательности  
вариабельной области  
легкой цепи

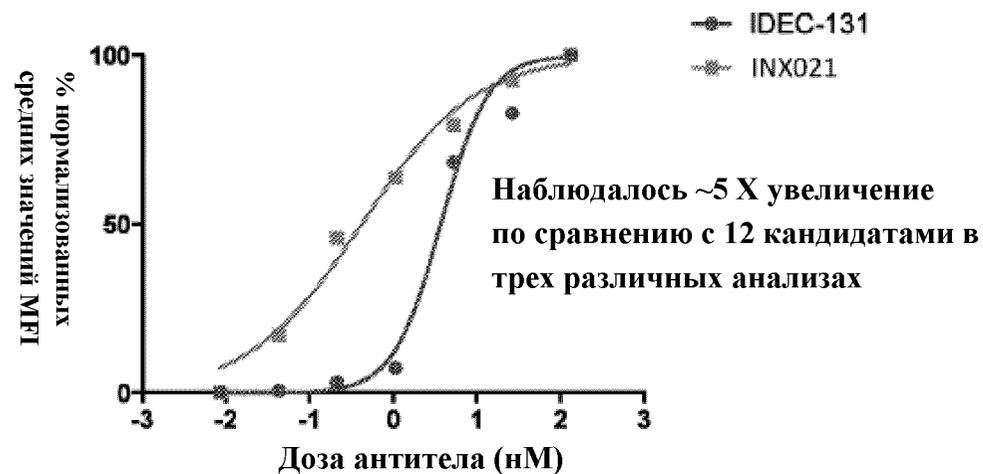
Фигура 2С

# Улучшенная специфическая активность: с применением эпитопа IDEC

Связывание CD40L на клетках Jurkat

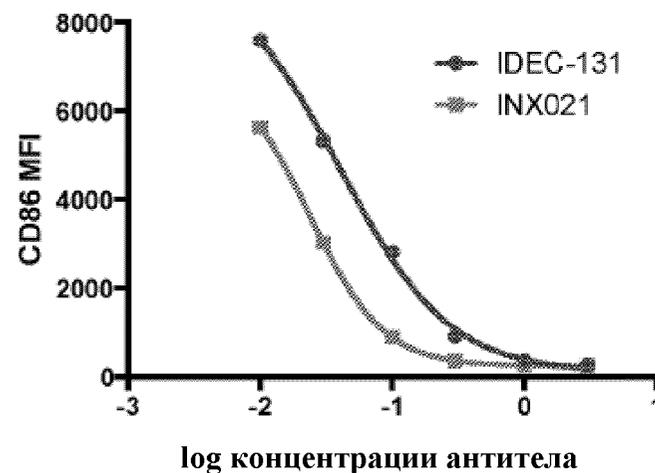
## Фигура 3

INX021 проявляет лучшее связывание CD40L на Т-клетках



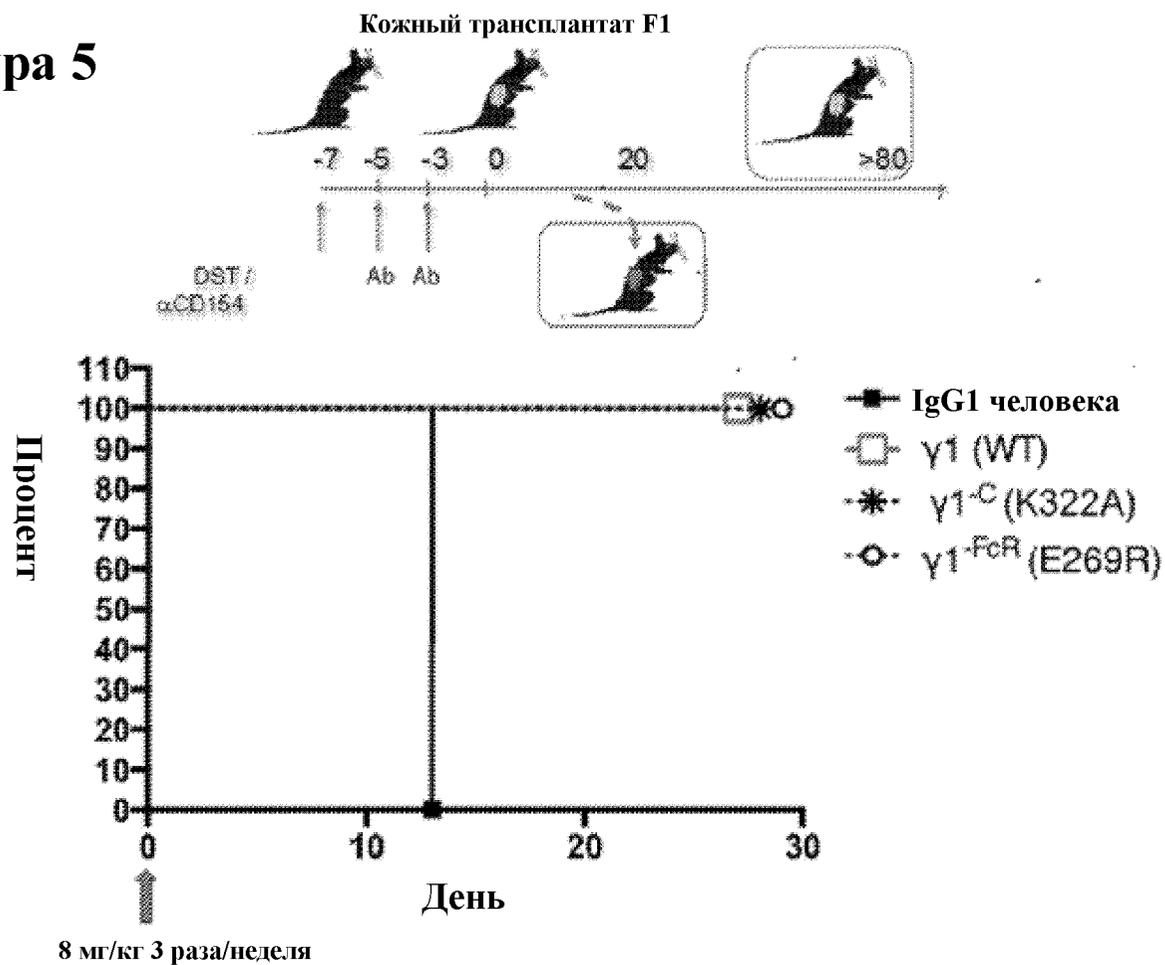
## Фигура 4

INX021 проявляет более сильное ингибирование управляемой CD40L Т-клетками активации В-клеток

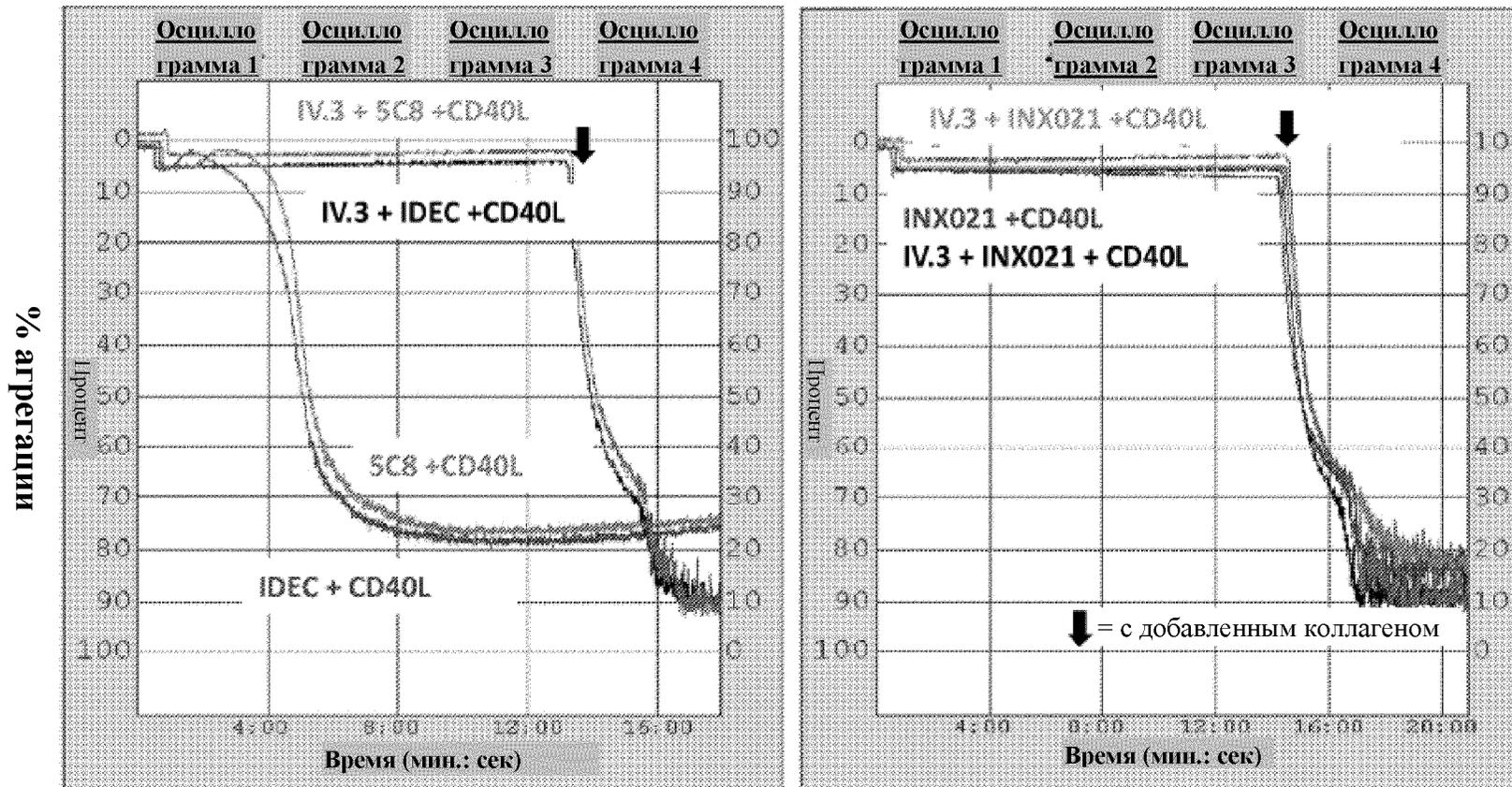


# Мутанты FcR hIgG-антитела к mCD40L индуцируют толерантность

## Фигура 5



Мутанты FcR hIgG1-антитела к CD40L не индуцируют агрегацию тромбоцитов



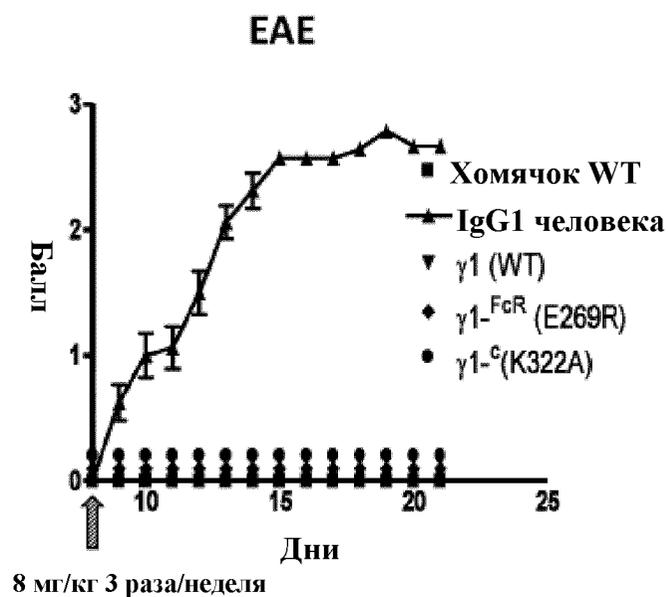
Иммунные комплексы мутантов FcR не индуцировали активацию выделенных тромбоцитов мыши либо человека *in vitro*.

Фигура 6

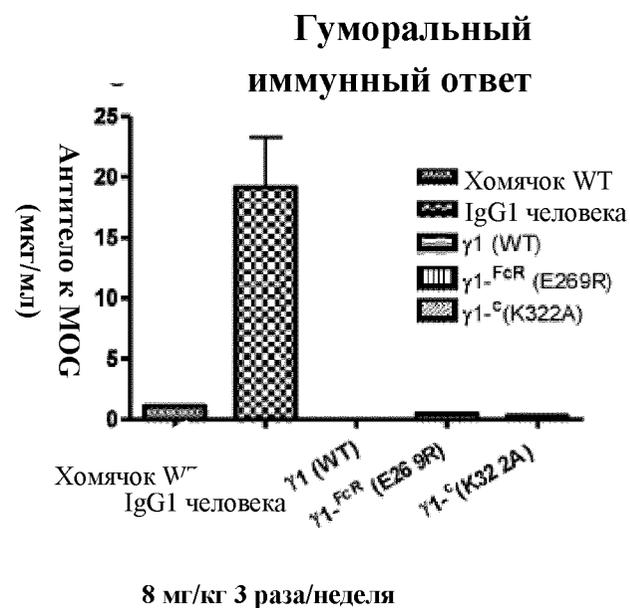


## Активность мутантов FcR/C1q антител к mCD40L

Связывание FcR/C1q остается активным в моделях, представляющих интерес, таких как EAE, толерантность и иммунный ответ на MOG



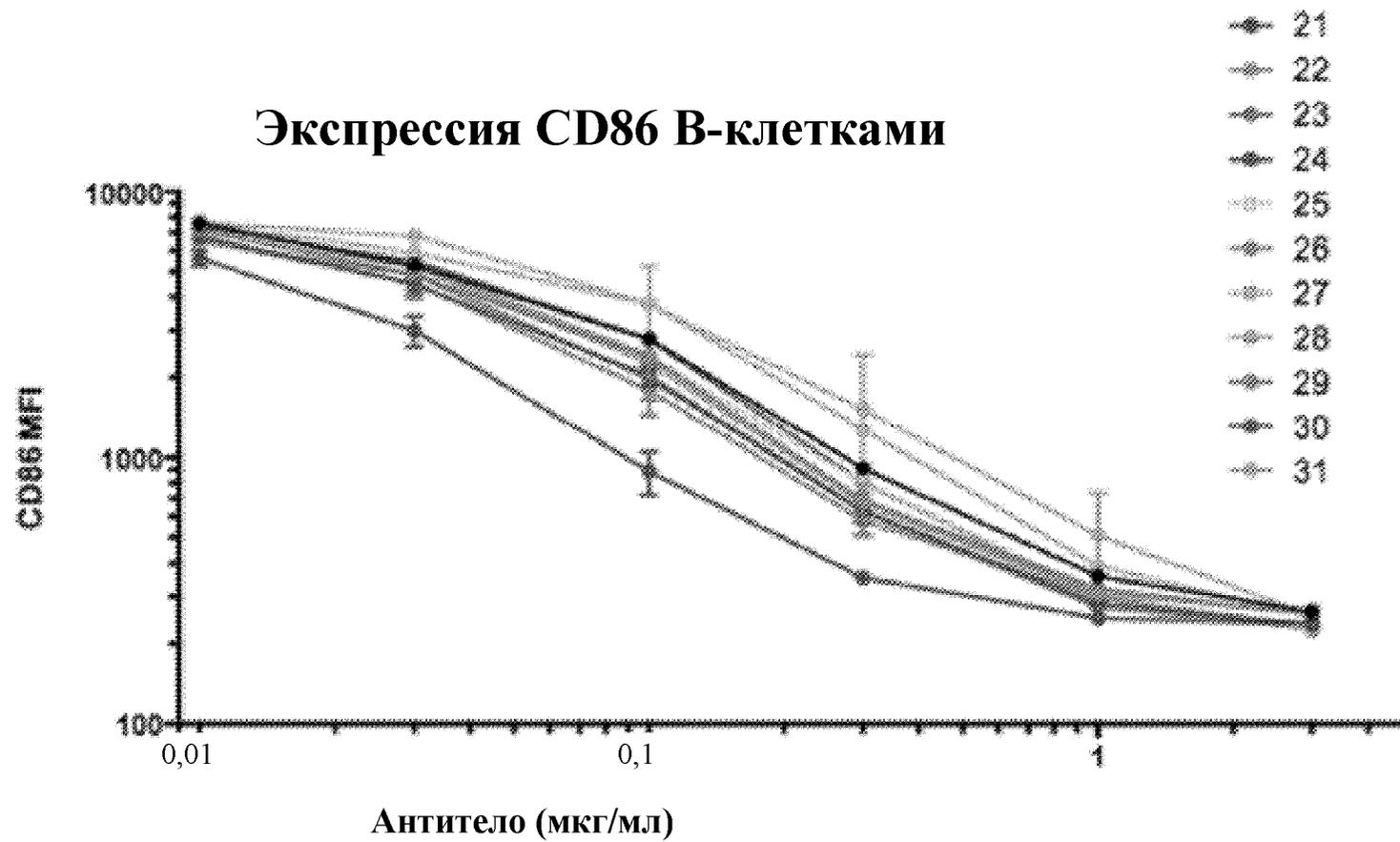
Фигура 8А



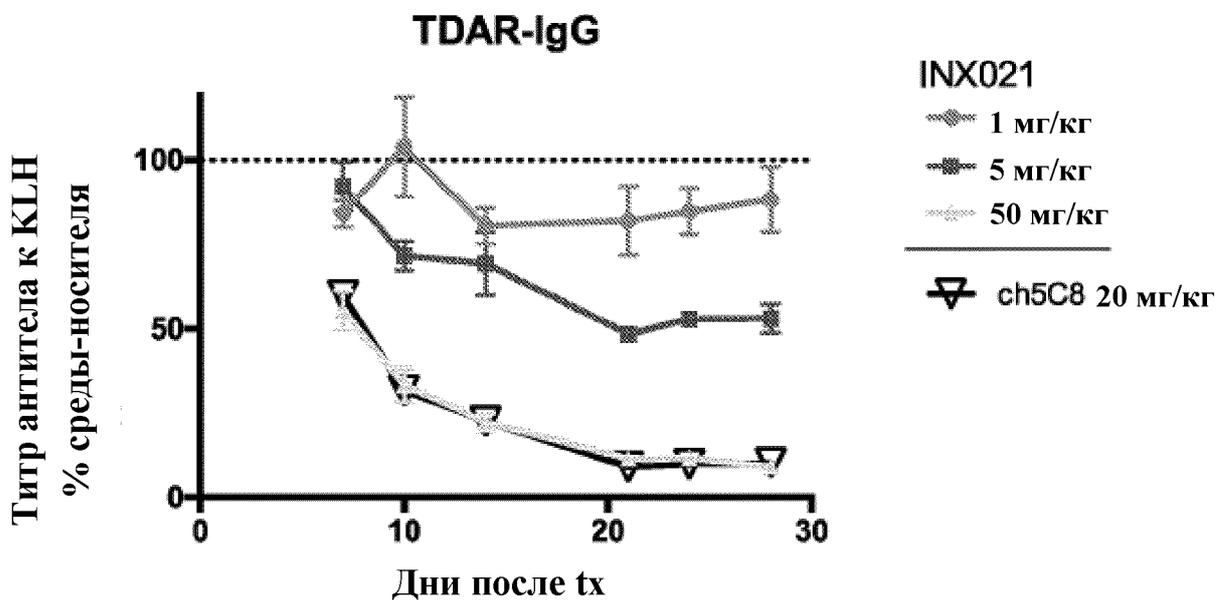
Фигура 8В

Фигура 9

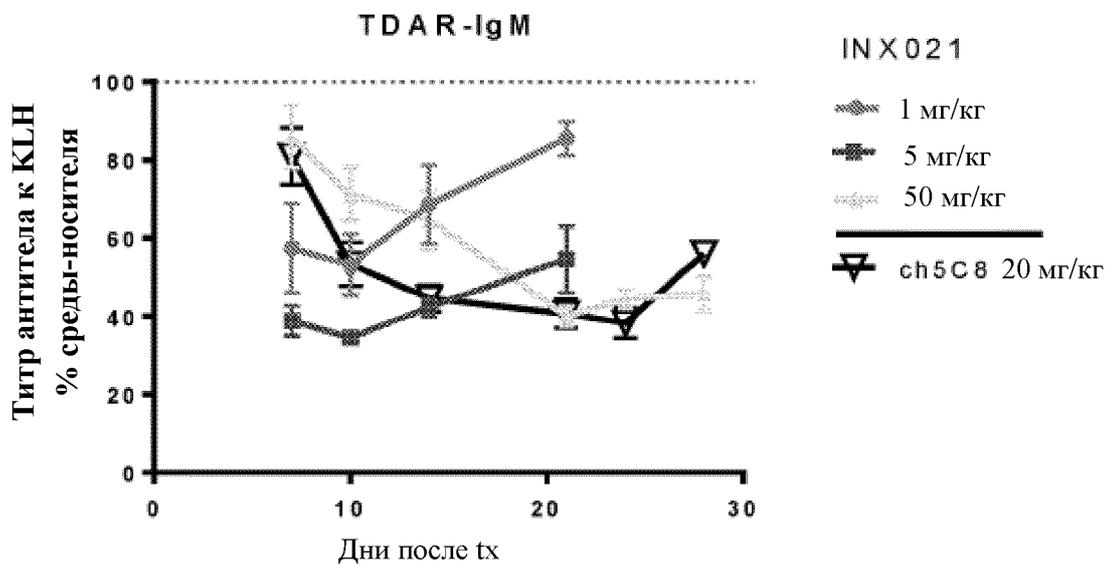
Экспрессия CD86 В-клетками



Фигура 10А



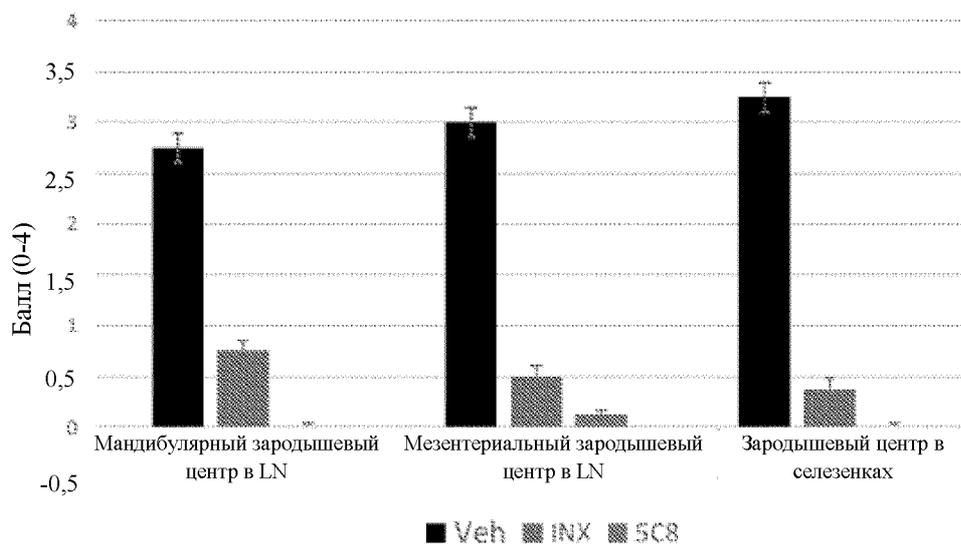
Фигура 10В



**Результаты TDAR:** TDAR (TOP) IgG по сравнению с солевым раствором в качестве контроля (пунктирная линия). TDAR (низ) IgM по сравнению с солевым раствором в качестве контроля (пунктирная линия).

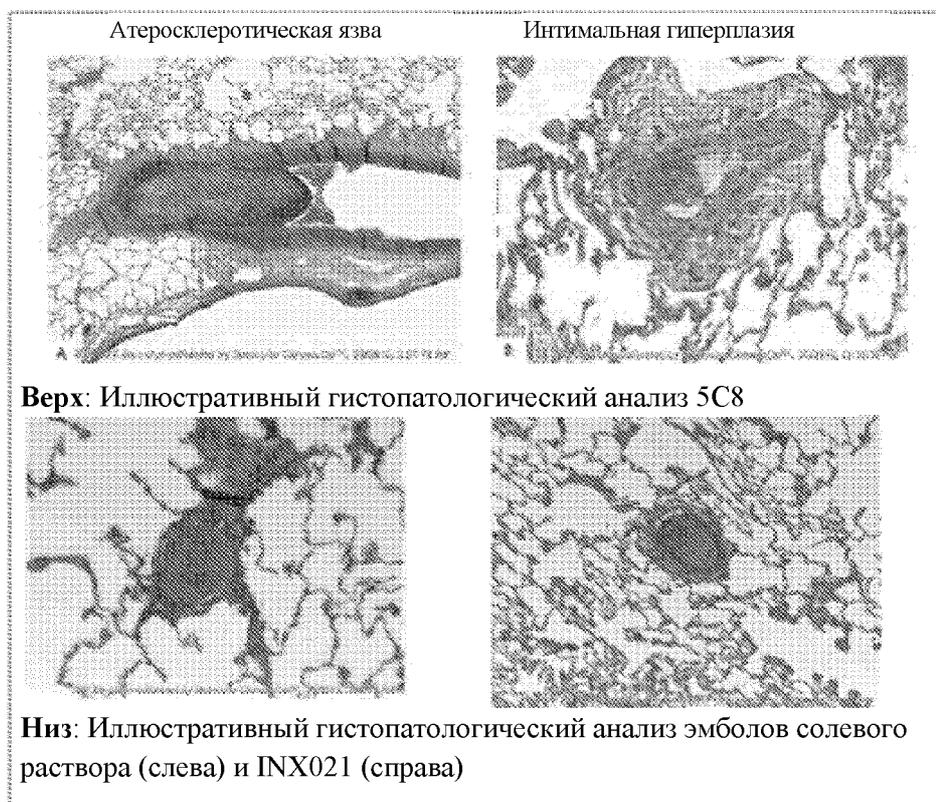
Фигура 11А

### Балл оценки зародышевых центров



**Баллы оценки зародышевых центров (выше)** Число зародышевых центров и степень их насыщенности клетками в селезенках и LN обработанных животных.

Фигура 11В



## Фигура 12

Краткое описание частоты возникновения очагов поражения по сравнению с опубликованными данными относительно эмболов в UCSB:

(CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study *Arthritis Res Ther.* 2015; 17(1): 234.)

Группа введения дозы	Пораженные животные (%)	Изучение общего количества срезов легких	Пораженные срезы легких (%)
<b>Известные контрольные объекты</b>			
Солевой раствор	7 (50%)	406	2,5%
<b>Пегилированный Fab от Biogen/UCSB</b>			
Солевой раствор	1 (25%)	116	0,9%
Пегилированный Fab CDP765	3 (37,5%)	203	2,0%
Агликозилированная форма 5C8	3 (37,5%)	232	1,3%
5C8 человека	5 (62,5%)	232	17,6%
<b>ImmuNext INX021</b>			
Среда-носитель	2 (50%)	174	1,7%
INX021	3 (37,5%)	232	3,4%
Ch5C8	6 (75%)	232	3,8%

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202290997**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 16/28, A61K 39/395, 45/06, A61P 1/04, 1/16, 11/00, 15/00, 13/12, 17/00, 19/00, 21/00, 25/00, 27/00, 29/00, 31/00, 3/10, 37/00, 5/00, 7/003/10, 37/00, 5/00, 7/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
P, A	US 2016/0060348 A1 (THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 03.03.2016, параграфы [0074], [0087], таблицы 2-4, фигуры 10-13, формула	1-20
P, A	WO 2015/155174 A1 (LOKON PHARMA AB) 15.10.2015, параграф [0215], формула	1-20
A	US 2014/0220031 A1 (BIOGEN IDEC MA INC et al.) 07.08.2014, параграфы [0079], [0301]-[0312], формула	1-20
A	EP 2306191 A1 (MILTENYI BIOTEC GMBH) 06.04.2011, параграф [0081], формула	1-20

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

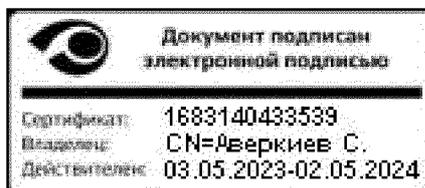
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 27 июня 2023 (27.06.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202290997**

**КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)**

**C07K 16/28 (2006.01)**  
**A61K 39/395 (2006.01)**  
**A61 K 45/06 (2006.01)**  
**A61P 1/04 (2006.01)**  
**A61P 1/16 (2006.01)**  
**A61P 11/06 (2006.01)**  
**A61P 15/00 (2006.01)**  
**A61P 13/12 (2006.01)**  
**A61P 7/00 (2006.01)**  
**A61P 17/00 (2006.01)**  
**A61P 19/00 (2006.01)**  
**A61P 21/00 (2006.01)**  
**A61P 25/00 (2006.01)**  
**A61P 27/00 (2006.01)**  
**A61P 29/00 (2006.01)**  
**A61P 31/00 (2006.01)**  
**A61P 3/10 (2006.01)**  
**A61P 37/00 (2006.01)**  
**A61P 5/00 (2006.01)**