

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046388**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.07

(21) Номер заявки
202190094

(22) Дата подачи заявки
2019.06.28

(51) Int. Cl. **A61P 37/06** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD40 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(31) 62/691,766

(32) 2018.06.29

(33) US

(43) 2021.04.21

(86) PCT/US2019/039715

(87) WO 2020/006347 2020.01.02

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

(72) Изобретатель:
**Штеффен Йюрген Теодор (DE),
Джозеф Дэвид П., Хилберт Джеймс
Майкл, Равва Патанджали (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) US-A1-2011243932

WO-A1-9731025

WO-A1-03029296

US-A1-2003165499

CHE-LEUNG LAW ET AL.: "Therapeutic Interventions Targeting CD40L (CD154) and CD40: The Opportunities and Challenges" In: "Therapeutic Targets of the TNF Superfamily", 1 January 2009 (2009-01-01), Springer New York, New York, NY, XP055096524, ISSN: 0065-2598 ISBN: 978-0-38-789520-8, vol. 647, pages 8-36, DOI: 10.1007/978-0-387-89520-8_2, page 20, paragraph 3 - page 21, paragraph 2

ALBACH FREDRIK N. ET AL.: "Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Rising Doses of BI 655064, an Antagonistic Anti-CD40 Antibody in Healthy Subjects: a Potential Novel Treatment for Autoimmune Diseases", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 74, no. 2, 10 November 2017 (2017-11-10), pages 161-169, XP036396160, ISSN: 0031-6970, DOI: 10.1007/S00228-017-2362-8 [retrieved on 2017-11-10], abstract, Methods, Results, Discussion

WO-A2-2006125117

CHRISTIAN SCHWABE ET AL.: "Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Multiple Rising Doses of BI 655064, an Antagonistic Anti-CD40 Antibody, in Healthy Subjects: A Potential Novel Treatment for Autoimmune Diseases", JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY., vol. 58, no. 12, 16 August 2018 (2018-08-16), pages 1566-1577, XP055623524, US ISSN: 0091-2700, DOI: 10.1002/jcph.1278, abstract; figures 2, 3; tables 1, 2

(57) Изобретение относится к новым антагонистическим гуманизированным антителам против CD40, к терапевтическим и диагностическим способам, а также к композициям для их применения.

B1

046388

046388

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение, в целом, относится к гуманизированным антителам против CD40 для диагностического и терапевтического применения. Более конкретно, описаны гуманизированные антитела против CD40 и способы применения для лечения различных заболеваний или нарушений, для которых характерно наличие клеток, экспрессирующих CD40. Также раскрыты фармацевтические композиции и наборы, содержащие гуманизированное антитело против CD40.

Предпосылки создания изобретения

CD40 представляет собой 48kDa интегральный мембранный гликопротеин типа I с молекулярной массой 48 кДа и является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО). CD40 экспрессируется на различных типах клеток, включая нормальные и неопластические В-клетки, интердигитальные клетки, карциномы, эпителиальные клетки (например, кератиноциты), фибробласты (например, синовиоциты) и тромбоциты. Он также присутствует на моноцитах, макрофагах, некоторых эндотелиальных клетках и фолликулярных дендритных клетках. CD40 экспрессируется на ранних стадиях онтогенеза В-клеток, появляясь на предшественниках В-клеток после появления CD10 и CD19, но до экспрессии CD21, CD23, CD24 и появления поверхностного иммуноглобулина M (sIgM) (Uckun et al., 1990, Blood, 15:2449). CD40 был также обнаружен на миндалинах и плазматических клетках костного мозга (Pellat-Decounynck et al., 1994, Blood 84:2597).

Лигандом CD40 является CD40L (также упоминается как CD154, gp39, и TRAP), член суперсемейства ФНО. CD40L представляет собой трансмембранный белок, который экспрессируется главным образом на активированных CD4⁺ Т-клетках и небольшой субпопуляции CD8⁺ Т-клеток (Reviewed by (Van Kooten C. и Banchereau, 2000).

Взаимодействие CD40 с CD40L индуцирует как гуморальные, так и клеточно-опосредованные ответы. CD40 регулирует эту пару лиганд-рецептор для активации В-клеток и других антигенпрезентирующих клеток (APC), включая дендритные клетки (DC) (см., обзор (Toubi и Shoenfeld, 2004); (Kiener, et al., 1995). Функция CD40 на В-клетках широко изучена. Активация CD40 на В-клетках индуцирует пролиферацию, дифференцировку в секретирующие антитела клетки и переключение изотипа в зародышевых центрах вторичных лимфоидных органов. Исследования *in vitro* продемонстрировали непосредственные воздействия активации CD40 на выработку цитокинов (IL-6, IL-10, ФНО- α , LT- α), экспрессию молекул адгезии и костимулирующих рецепторов (ICAM, CD23, CD80 и CD86) и повышенную экспрессию молекул МНС класса I, МНС класса II и транспортера ТАВ В-лимфоцитами (Liu, et al., 1996). В большинстве этих процессов CD40 действует согласованно или с цитокинами, или с другими взаимодействиями рецептор-лиганд.

Передача сигналов CD40 на моноцитах и DC приводит к повышенной выживаемости, а также к секреции цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, ФНО- α и MIP-1 α). Лигирование CD40 на этих APC также приводит к повышенной регуляции костимулирующих молекул, таких как (ICAM-1, LFA-3, CD80 и CD86). Активация рецепторов CD40 является одним из имеющих решающее значение сигналов, которые приводят к полному созреванию DC в эффективные APC, обеспечивающие Т-клеточную активацию (Banchereau and Steinman, 1998) (Van Kooten C. and Banchereau, 2000).

Недавние исследования на мышинных моделях показали, что передача сигналов CD40 на дендритных клетках также играет важную роль в генерации клеток TH17, которые рассматриваются как медиаторы аутоиммунитета при таких заболеваниях, как артрит и рассеянный склероз (Iezzi, et al., 2009) (Perona-Wright, et al., 2009).

Доступность мышей с нокаутом по CD40 и CD40L, а также агонистических и антагонистических антимышинных антител дала возможность изучить роль взаимодействий CD40-CD40L на нескольких моделях заболеваний. Было продемонстрировано, что введение блокирующего анти-CD40L благоприятно на нескольких моделях аутоиммунитета, включая спонтанные заболевания, такие как волчаночный нефрит у мышей SNF1 или диабет у мышей NOD, или при экспериментально индуцированных формах заболевания, таких как коллаген-индуцированный артрит (CIA) или экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE) (Toubi и Shoenfeld, 2004). CIA у мышей был ингибирован посредством mAb анти-CD40L, которое блокировало развитие воспаления суставов, титры сывороточных антител к коллагену, инфильтрацию воспалительных клеток в подсиновиальную ткань в дополнение к эрозии хряща и кости (Durie, et al., 1993). Как для волчаночного нефрита, так и для EAE было продемонстрировано, что анти-CD40L также могут облегчить текущее заболевание, подтверждая роль CD40-CD40L в эффекторной фазе заболевания (Kalled, et al., 1998); (Howard, et al., 1999).

Роль взаимодействий CD40-CD40L в развитии EAE также изучалась на CD40L-дефицитных мышях, несущих трансгенный Т-клеточный рецептор, специфичный для основного белка миелина. У этих мышей не развился EAE после примирования антигеном, а CD4⁺ Т-клетки оставались неподвижными и не производили INF- γ (Grewal, et al., 1996).

Кроме того, ингибирующие антитела, направленные против CD40, показали положительные эффекты на моделях воспалительных заболеваний, таких как EAE. Ламан и его коллеги продемонстрировали, что антагонистическое мышинное mAb mu5D12 против CD40 человека и химерная версия этого mAb эф-

фактивно предотвращают клиническую экспрессию хронического демиелинизирующего ЕАЕ у беспородных мартышек (Laman, et al., 2002); (Boon, et al., 2001). Последующее исследование показало, что терапевтическое лечение химерными антителами против CD40 человека снижает воспаление, обнаруживаемое на МРТ, и задерживает увеличение ранее существовавших поражений головного мозга в модели ЕАЕ мартышки (Hart, et al., 2005).

Антитела против CD40 с агонистической активностью были протестированы на мышинных моделях артрита с некоторыми противоречивыми результатами. Как и ожидалось для иммуностимулирующего средства, было показано, что агонистическое mAb FGK45 против CD40 мыши обостряет заболевание на мышинной модели CIA DBA/1 (Tellander, et al., 2000). Тем не менее в другой хронической модели CIA FGK45 и другом агонистическом mAb против CD40 мыши, 3/23, оба проявляли положительные терапевтические эффекты (Mauri, et al., 2000). В этой группе было сделано предположение, что агонистические антитела в этой терапевтической схеме лечения имеют положительный эффект, индуцируя иммунное отклонение в сторону ответа Th2 со сниженными уровнями INF- γ и повышенными уровнями IL-4 и IL-10 (Mauri, et al., 2000).

Также документально подтверждено предотвращение отторжения трансплантата за счет блокирования взаимодействий CD40/CD154. Использование ch5D12, химерного антагониста анти-CD40, в исследованиях почечного аллотрансплантата у макак-резусов показывает, что антагонизма CD40 достаточно для модификации заболевания и увеличения среднего времени выживания за последние 100 дней. Когда ch5D12 был объединен с антителом против CD86 и его вводили только в начале исследований аллотрансплантата с последующим длительным лечением циклоспорином, было достигнуто среднее время выживания более 4 лет, указывая на то, что эта комбинация потенциально может вызывать толерантность (Haanstra, et al., 2005).

Таким образом, существует более чем достаточно доклинических исследований, которые представляют доказательства решающей роли диады CD40-CD40L в управлении эффективным Т-клеточно-зависимым иммунным ответом. Таким образом, блокирование передачи сигнала CD40 считается подходящей и необходимой терапевтической стратегией для подавления патогенного аутоиммунного ответа при таких заболеваниях, как РА, рассеянный склероз или псориаз. Однако на сегодняшний день не существует антител к CD40, которые были одобрены для терапевтического вмешательства при таких нарушениях, поскольку было обнаружено, что ранее разрабатываемые антитела против CD40 обладают значительными побочными эффектами. Таким образом, остается существенная потребность в терапевтических средствах, которые можно использовать для вмешательства в действие CD40-CD40L и блокирования передачи сигнала CD40. Эта потребность может быть удовлетворена с помощью новых гуманизированных антител против CD40, которые специфически связывают CD40 и проявляют антигенсвязывающую специфичность, аффинность, а также фармакокинетические и фармакодинамические свойства, которые позволяют использовать их в терапевтическом вмешательстве при нарушениях, связанных с CD40.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложено гуманизированное моноклональное антитело, при этом указанное антитело специфически связывается с CD40 человека, имеющим антагонистическую активность IC₅₀ менее 1 нМ и не имеет агонизма до 100 мкг/мл в отношении пролиферации В-клеток, где указанное антитело дополнительно отличается тем, что антитело имеет период полураспада *in vivo* у нечеловеческих приматов, составляющий по меньшей мере 10 дней.

Гуманизированное моноклональное антитело дополнительно может отличаться тем, что антитело имеет период полураспада у яванских макак более 8 дней в дозе менее 30 мг/кг.

В примерных вариантах осуществления предлагаемое в изобретении антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8.

В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, имеющего аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

В других вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, который содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

В отдельных вариантах осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, отличается тем, что оно содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где последовательность CDR1 тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9 - SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 SEQ ID NO: 17; и при этом последовательность CDR1 легкой цепи имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 легкой цепи выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 23, и последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 25.

В отдельных вариантах осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, отличается тем, что оно содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 16; где указанное антитело содержит последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 19, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 22 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 24.

В других конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, отличается тем, что оно содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 14 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 16; где указанное антитело содержит последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 20, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 22 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 24.

В других конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, отличается тем, что оно содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 14 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 16; где указанное антитело содержит последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 20, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 22 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 24.

В других конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело, описанное в настоящем документе, отличается тем, что оно содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 и последовательность CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 17; где указанное антитело содержит последовательность CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 25.

В настоящем документе также описаны отдельные последовательности для тяжелых цепей предпочтительных антител в соответствии с изобретением. Например, изобретение относится к антителу против CD40, содержащему последовательность переменного домена тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-4. Кроме того, антитело против CD40 отличается тем, что содержит последовательность переменного домена легкой цепи любой из SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8.

Также рассматривается гуманизованное антитело или фрагмент антитела, имеющий переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, имеющему переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, имеющему переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, имеющему переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, имеющему переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретение относится к гуманизованному антителу или фрагменту антитела, имеющему переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно.

тем, что указанные антитела связываются с CD40 человека в присутствии 50% человеческой сыворотки со скоростью менее чем в два раза.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть дополнительно охарактеризованы тем, что указанное антитело вызывает ингибирование продукции IgM и IgG у млекопитающих в концентрации 1 мг/кг.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением можно использовать в различных терапевтических, профилактических, диагностических и других методах. Например, в настоящем изобретении описан способ блокирования функции человеческого CD40 у млекопитающего, включающий в себя введение указанному млекопитающему композиции, содержащей антитело в соответствии с изобретением в количестве, достаточном для блокирования опосредованного CD40 иммунного ответа у указанного млекопитающего.

Также в настоящем изобретении предлагается способ лечения или ослабления болезни "трансплантат против хозяина" у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему композиции, содержащей антитело в соответствии с изобретением в количестве, достаточном для уменьшения одного или нескольких симптомов болезни "трансплантат против хозяина" у указанного животного.

В качестве примера аутоиммунное или воспалительное заболевание может включать, но не ограничиваться этим, ревматоидный артрит, волчаночный нефрит, рассеянный склероз, пролиферативный волчаночный гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), псориаз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), болезнь Крона и системную красную волчанку (СКВ), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреотоксикоз/болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный кардит, болезнь Аддисона, преждевременную менопаузу, сахарный диабет 1 типа, синдром Гудпасчера, миастению гравис, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую лейкопению, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит (отрицательный HBsAg), криптогенный цирроз печени, синдром Шегрена, дерматомиозит, склеродермию, смешанные заболевания соединительных тканей, дискоидную красную волчанку и системный васкулит. В примерных вариантах осуществления у млекопитающего ревматоидный артрит.

Способы в соответствии с изобретением могут дополнительно включать в себя введение второго терапевтического средства, выбранного из группы, включающей антагонист ФНО, модифицирующее болезнь противоревматическое лекарственное средство, антагонист CTLA4, mAb против рецептора IL-6 и mAb против CD20.

В отдельных вариантах осуществления воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание, которое связано с клетками, экспрессирующими как CD40, так и CD20.

В конкретных способах лечение включает введение композиции антител парентеральным путем.

В конкретных способах лечение включает введение композиции антител внутривенно или подкожно.

Дополнительные способы в соответствии с изобретением включают ингибирование продукции антител В-клетками у пациента-человека, включающее введение указанному пациенту-человеку эффективного количества антитела против CD40 в соответствии с изобретением.

Более конкретно, пациент-человек имеет воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание, которое связано с клетками, экспрессирующими CD40.

В примерных вариантах осуществления пациент-человек страдает от аутоиммунного заболевания, выбранного из группы, состоящей из аутоиммунного или воспалительного заболевания, выбранного из группы, которая охватывает ревматоидный артрит, рассеянный склероз, пролиферативный волчаночный гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), псориаз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), болезнь Крона и системную красную волчанку (СКВ), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреотоксикоз/болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный кардит, болезнь Аддисона, преждевременную менопаузу, сахарный диабет 1 типа, синдром Гудпасчера, миастению гравис, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую лейкопению, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит (отрицательный HBsAg), криптогенный цирроз печени, синдром Шегрена, дерматомиозит, склеродермию, смешанные заболевания соединительных тканей, дискоидную красную волчанку и системный васкулит.

Другой способ в соответствии с изобретением относится к ингибированию роста клеток, экспрессирующих человеческий антиген CD40, включающему введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетки, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с антигеном CD40 на поверхности клеток человека, при этом связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном CD40 ингибирует рост или дифференцировку клеток.

Также предлагается способ лечения субъекта, имеющего связанное с CD40 заболевание, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD40 человека, при этом связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с CD40 ингибирует рост или дифференцировку клеток связанного с CD40 заболевания. Клетками могут быть, но не ограничиваясь этим,

В-лимфобластоидные клетки, клетки поджелудочной железы, клетки легких, клетки молочной железы, клетки яичников, клетки толстой кишки, клетки предстательной железы, клетки кожи, клетки головы и шеи, клетки мочевого пузыря, клетки кости или клетки почек.

Способ лечения для ингибирования роста или дифференцировки клеток может быть полезен при лечении ревматоидного артрита, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, хронического лимфолейкоза, лимфомы Беркитта, множественной миеломы, Т-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, макроглобулинемии Вальденстрема или саркомы Капоши.

Также предлагается способ индукции истощения периферических В-клеток, включающий введение в клетки антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с изобретением, при этом указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с антигеном CD40 на поверхности клетки человека, при этом связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном CD40 вызывает истощение клеток.

В отдельных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, имеющему иммунное расстройство. Например, иммунное расстройство представляет собой ревматоидный артрит или системную красную волчанку.

Также рассматривается способ лечения ревматоидного артрита у субъекта, включающий введение указанному субъекту антитела в соответствии с изобретением, где указанное антитело представляет собой антагонистическое антитело, которое блокирует функцию CD40 у указанного субъекта.

Также рассматривается способ лечения системной красной волчанки, или волчаночного нефрита у субъекта, включающий введение указанному субъекту антитела в соответствии с изобретением, где указанное антитело представляет собой антагонистическое антитело, которое блокирует функцию CD40 у указанного субъекта.

Предпочтительно антитело вводят в количестве, эффективном для ингибирования дифференцировки В-клеток и переключения изотипа антитела у указанного субъекта.

В других вариантах осуществления антитело вводят в количестве, эффективном для ингибирования продукции цитокинов и хемокинов и повышения регуляции молекул адгезии в Т-клетках и макрофагах у указанного субъекта. Предпочтительно антитело вводят в количестве, эффективном для ингибирования активации дендритных клеток у указанного субъекта.

В других вариантах осуществления способ дополнительно отличается тем, что антитело вводят в количестве, эффективном для ингибирования продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, простагландинов, и понижения регуляции молекул адгезии в неиммунных клетках указанного субъекта.

В отдельных вариантах осуществления антитело вводят в сочетании со схемой, включающей в себя введение метотрексата и/или введение энбрела/хумиры.

Субъект, получающий терапию, представляет собой пациента, имеющего ревматоидный артрит и не поддающегося лечению только метотрексатом.

В отдельных вариантах осуществления способ включает лечение указанного субъекта схемой, включающей введение метотрексата и/или введение энбрела/хумиры.

Способ в соответствии с изобретением может быть дополнительно охарактеризован тем, что лечение указанного субъекта указанным антагонистическим антителом против CD40 имеет более высокую эффективность, чем лечение одним метотрексатом, одним энбrelом, комбинацией энбрел+метотрексат.

Способ в соответствии с изобретением может быть дополнительно охарактеризован тем, что лечение указанного субъекта указанным антагонистическим антителом против CD40 имеет более высокую эффективность, чем лечение посредством энбрел +МТХ у пациентов, у которых был неадекватный ответ на метотрексат.

В отдельных вариантах осуществления антитело вводят в сочетании со схемой, включающей в себя средство против ФНО.

В отдельных вариантах осуществления субъект характеризуется тем, что имеет ревматоидный артрит и не отвечал на лечение только средством против ФНО. В таких вариантах осуществления способ может включать лечение указанного субъекта с помощью схемы, включающей в себя лечение средством против ФНО в сочетании с указанным антагонистическим антителом против CD40.

В отдельных вариантах осуществления лечение указанного субъекта указанным антагонистическим антителом против CD40 имеет более высокую эффективность по сравнению с лечением средством против ФНО.

В еще других вариантах осуществления способ отличается тем, что лечение указанного субъекта указанным антагонистическим антителом против CD40 имеет более высокую эффективность, чем лечение посредством оренисии или ритуксана у пациентов, у которых был неадекватный ответ на лечение только средством против ФНО.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе; и (ii) фармацевтически приемлемый наполнитель. В таких композициях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть преимущественно конъюгирован со вторым средством, таким как, например, цитотоксиче-

ский агент, ПЭГ-носитель, фермент или маркер.

Также в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

Также в настоящем изобретении предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи любой из SEQ ID NO: 5-8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, или SEQ ID NO: 76.

Изобретение также относится к применению описанных в настоящем документе антител для изготовления лекарственного средства для блокирования функции человеческого CD40 у млекопитающего, при этом лекарственное средство блокирует опосредованный CD40 иммунный ответ у указанного млекопитающего.

В одном варианте осуществления изобретение относится к изготовлению лекарственного средства для лечения или ослабления болезни трансплантат против хозяина у млекопитающего.

В примерных вариантах осуществления лекарственное средство изготавливают для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, выбранного из группы, которая включает в себя ревматоидный артрит, волчаночный нефрит, рассеянный склероз, пролиферативный волчаночный гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), псориаз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), болезнь Крона и системную красную волчанку (СКВ), тиреоидит Хашимото, первичную микседему, тиреотоксикоз/болезнь Грейвса, пернициозную анемию, аутоиммунный атрофический гастрит, аутоиммунный кардит, болезнь Аддисона, преждевременную менопаузу, сахарный диабет 1 типа, синдром Гудпасчера, миастению гравис, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую лейкопению, первичный билиарный цирроз, активный хронический гепатит (отрицательный HBsAg), криптогенный цирроз печени, синдром Шегрена, дерматомиозит, склеродермию, смешанные заболевания соединительных тканей, дискоидную красную волчанку и системный васкулит.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство может дополнительно содержать второе терапевтическое средство, выбранное из группы, которая включает в себя антагонист ФНО, модифицирующее болезнь противоревматическое лекарственное средство, антагонист CTLA4, mAb против рецептора IL-6 и mAb против CD20.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения парентеральным путем введения. Лекарственное средство может быть изготовлено для применения внутривенно или подкожно.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител, описанных в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для ингибирования выработки антител В-клетками у пациента-человека.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител, описанных в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для ингибирования роста и/или дифференцировки клеток, экспрессирующих человеческий антиген.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител, описанных в настоящем документе, для изготовления лекарственного средства для лечения субъекта, имеющего связанное с CD40 расстройство, где связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента в указанном лекарственном средстве с CD40 ингибирует рост или дифференцировку клеток связанного с CD40 расстройства.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в лечении клеток связанного с CD40 расстройства, выбранных из В-лимфобластоидных клеток, клеток поджелудочной железы, клеток легких, клеток молочной железы, клеток яичников, клеток толстой кишки, клеток предстательной железы, клетки кожи, клеток головы и шеи, клеток мочевого пузыря, клеток кости или клеток почки.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в лечении хронического лимфоцитарного лейкоза, лимфомы Беркитта, множественной миеломы, Т-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина, макроглобулинемии Вальденстрема или саркомы Капоши.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител в соответствии с изобретением в изготовлении лекарственного средства для индукции истощения периферических В-клеток, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент лекарственного средства специфически связывается с антигеном CD40 на поверхности клетки человека, причем связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном CD40 вызывает истощение клеток.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в лечении субъекта, имеющего иммунное расстройство.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в лечении ревматоидного артрита

или системной красной волчанки.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител в соответствии с изобретением в изготовлении лекарственного средства для лечения ревматоидного артрита у субъекта.

Другой вариант осуществления предполагает применение антител в соответствии с изобретением в изготовлении лекарственного средства для лечения системной красной волчанки или волчаночного нефрита у субъекта.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в ингибировании дифференцировки В-клеток и переключения изотипа антитела у указанного субъекта.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в ингибировании выработки цитокинов и хемокинов и повышения регуляции молекул адгезии в Т-клетках и макрофагах у указанного субъекта.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в ингибировании активации дендритных клеток у указанного субъекта.

Лекарственное средство может быть изготовлено для применения в ингибировании выработки провоспалительных цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, простагландинов и понижения регуляции молекул адгезии в неиммунных клетках у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство изготавливают в виде комбинированного лекарственного средства для введения в сочетании со схемой, включающей введение метотрексата и/или введение энбрела/хумиры.

В других вариантах осуществления лекарственное средство изготавливают в виде комбинированного лекарственного средства и лекарственное средство помимо антител в соответствии с изобретением, дополнительно содержит средство против ФНО.

Краткое описание нескольких видов чертежей

На фиг. 1 показан простой дизайн увеличения дозы. S-FU представляет собой наблюдение за безопасностью в динамике. * Относится к двум субъектам, рандомизированным к группе плацебо и восьми субъектам, рандомизированным к группе антитела в соответствии с настоящим изобретением.

† Относится к S-FU, который был дольше для когорты 4 (56 дней вместо 42 дней).

На фиг. 2 показаны концентрации в крови до приёма очередной дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением в дни 8, 15 и 22 (Cpre) и минимальная концентрация в день 29.

На фиг. 3А показан средний арифметический процент занятости рецептора CD40 при лечении различными дозами.

На фиг. 3В показан процент ингибирования повышенной регуляции CD54 различными дозами.

Подробное описание изобретения

В настоящее время известно, что передача сигналов, опосредованная CD40, участвует в различных целевых расстройствах. Несмотря на доступность разнообразных доклинических данных, показывающих, что вмешательство в эти расстройства будет терапевтически благоприятным, остается потребность в антагонистических антителах против CD40, которые можно использовать при лечении аутоиммунных заболеваний. В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, распознающим CD40. Эти антитела также раскрыты в патенте США № 8,591,900 и WO 2011/123489, содержание каждого из которых включено в настоящий документ. В конкретных вариантах осуществления последовательность этих гуманизированных антител была идентифицирована на основе последовательностей некоторых свинцовых мышиных антител.

Несмотря на терапевтический прогресс последних лет, все еще существует неудовлетворенная потребность в новых способах лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и волчаночный нефрит. Известно, что взаимодействие рецептора CD40 на клеточной поверхности и его лиганда CD40L (CD154) играет главную роль в регуляции гуморального и клеточного иммунитета, и в патогенезе этих аутоиммунных заболеваний. Следовательно, взаимодействие CD40-CD40L является привлекательной мишенью для модуляции аутоиммунных заболеваний.

CD40 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухоли и экспрессируется на В-клетках, дендритных клетках, моноцитах, макрофагах, клетках почек и других неиммунных клетках. CD40 является ключевой костимулирующей молекулой, участвующей в развитии антиген-управляемого приобретенного иммунитета путем активации В-клеток и других антигенпрезентирующих клеток (APC), включая дендритные клетки и макрофаги, но также участвует в активации неиммунных резидентных клеток. CD40L является членом суперсемейства фактора некроза опухолей, который экспрессируется в основном активированными Т-клетками, а также активированными В-клетками и тромбоцитами. Связывание CD40 с CD40L приводит к повышению регуляции Е-селектина (CD62E), молекулы-1 адгезии сосудистых клеток (CD106), и молекулы-1 межклеточной адгезии (CD54), тем самым увеличивая маргинацию лейкоцитов и диапедез.

Взаимодействие CD40-CD40L, по-видимому, необходимо для оптимальной активации APC-Т-клеток. Считается, что путь CD40-CD40L особенно важен для усиления ответа Т-клеток и участвует в нескольких аутоиммунных заболеваниях. Было показано, что блокирование сигнального пути

CD40 ингибирует дифференцировку Т-хелперных клеток 1 (Th1) и поддержание иммунного ответа. Повышенная экспрессия CD40 и CD40L связана с активным заболеванием у пациентов с ревматоидным артритом. Повышенные уровни CD40L на В- и Т-клетках связаны с активностью заболевания при системной красной волчанке, а почечная экспрессия CD40 на мезангиальных клетках повышается у пациентов с волчаночным нефритом III и IV классов.

Преыдущая клиническая разработка моноклональных антител против CD40L потерпела неудачу из-за случаев тромбоза, которые были инициированы активацией и агрегацией тромбоцитов, возможно, из-за области Fc антител против CD40L, активирующих рецептор тромбоцитов FcγRIIa (CD32a). Недавние исследования показывают, что антитела, лишенные функциональной области Fc, не вызывают тромботических явлений, не способны активировать тромбоциты и сохраняют как фармакологическую активность, так и клиническую активность.

В одном варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой гуманизованное антагонистическое моноклональное антитело против CD40, которое избирательно связывает CD40 и блокирует взаимодействие CD40-CD40L; оно было разработано так, чтобы не иметь агонистической активности и предотвращать стимуляцию выработки цитокинов. Две заменяющие мутации в области Fc (Leu234Ala и Leu235Ala) были включены для предотвращения Fc-опосредованной антителозависимой или опосредованной комплементом клеточной цитотоксичности и активации тромбоцитов. Антитело в соответствии с настоящим изобретением продемонстрировало сильные и сравнимые связывающие свойства как в человеческих ($EC_{50}=6,85\pm 0,74$ нМ) В-клетках, так и в клетках яванского макака и сильное ингибирование индуцированной посредством CD40L пролиферации мононуклеарных клеток периферической крови без агонизма. При связывании с тромбоцитами антитело в соответствии с настоящим изобретением не изменяет активацию, агрегацию или функцию тромбоцитов. При доклинических исследованиях на яванских макаках с многократными дозами до 50 мг/кг антитела в соответствии с настоящим изобретением в течение 26 недель было продемонстрировано обратимое снижение уровней В-клеток, обратимое уменьшение зародышевых центров лимфоидных органов и хорошую общую переносимость без тромботических событий или соответствующее высвобождение цитокинов (и неопубликованные данные). Уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов в этих исследованиях составлял 50 мг/кг - самая высокая введенная доза (неопубликованные данные).

Как показано в примере 9, в исследовании однократного увеличения дозы у здоровых добровольцев увеличение однократных внутривенных (IV) и подкожных (SC) доз до 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением хорошо переносилось и показало высокий потенциал для блокирования пути CD40-CD40L. Наблюдали связанное с дозой увеличение занятости рецептора (RO) CD40 и ингибирование активации В-клеток (измеряемое по ингибированию повышенной регуляции CD54) после как внутривенного, так и подкожного введения дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Определения

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

В контексте настоящего описания клетка, которая эндогенно экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, для которой характерна поверхностная экспрессия CD40, включая, но не ограничиваясь только ими, здоровые и неопластические В-клетки, интердигитальные клетки, базальные эпителиальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные клетки, клетки миндалин и плазматические клетки костного мозга. В некоторых вариантах осуществления молекула CD40 представляет собой молекулу CD40 человека.

Антитела в соответствии с изобретением специфически связываются с человеческим рекомбинантным и нативным CD40. Гуманизованное моноклональное антитело, где указанное антитело специфически связывается с CD40 человека, обладающее антагонистической активностью IC_{50} менее чем 1 нМ, и не имеет агонизма вплоть до 100 мкг/мл при В-клеточной пролиферации и где указанное антитело дополнительно характеризуется тем, что антитело имеет время полураспада *in vivo* у нечеловеческих приматов, которое составляет по меньшей мере 10 дней.

Предпочтительно антитело специфически связывается с CD40 в конъюгате CD40-Fc с EC_{50} менее 1 нМ и CD40 в экспрессирующих CD40 клетках с EC_{50} менее 2,5 нМ. Антагонистические свойства антитела определяются тем, что оно имеет антагонистическую активность в отношении В-клеток или дендритных клеток IC_{50} менее 1 нМ. Кроме того, антитело обладает превосходными фармакокинетическими свойствами, имея увеличенный период полураспада *in vivo* по сравнению с другими антителами против CD40 (например, антителом 4D11 против CD40).

В контексте настоящего описания клетка, которая экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, характеризующуюся поверхностной экспрессией CD40, включая, помимо прочего, нормальные и

неопластические В-клетки, интердигитальные клетки, базальные эпителиальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные клетки, клетки миндалин и плазматические клетки костного мозга. В некоторых вариантах осуществления молекула CD40 представляет собой молекулу CD40 человека.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением распознают специфический "эпитоп антигена CD40" и "эпитоп CD40". В контексте настоящего описания эти понятия относятся к молекуле (например, пептиду) или фрагменту молекулы, способной к иммунореактивности с антителом против CD40, и, например, включают антигенную детерминанту CD40, распознаваемую любым из антител, имеющим комбинацию последовательности тяжелой цепи/легкой цепи, такую как легкой цепи SEQ ID NO: 26 с любой тяжелой цепью SEQ ID NO: 27, 28, 29 или 30; или легкой цепи SEQ ID NO: 31 с любой тяжелой цепью SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35; или легкой цепи SEQ ID NO: 36 с любой тяжелой цепью SEQ ID NO: 37, 38, 39 или 40. Эпитопы антигена CD40 могут быть включены в белки, фрагменты белков, пептиды и т.п. Эпитопы чаще всего представляют собой белки, короткие олигопептиды, имитаторы олигопептидов (т.е. органические соединения, имитирующие свойства связывания антител антигена CD40) или их комбинации.

Обобщенная структура антител или иммуноглобулина хорошо известна специалистам в данной области техники, эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, примерно 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротетрамерная молекула образуется за счет ковалентной дисульфидной связи между двумя идентичными тяжелыми цепями гетеродимеров. Хотя легкая и тяжелая цепи связаны вместе одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьируется в зависимости от изоформа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно распределенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на аминоконце вариабельный домен (V_H), за которым следуют три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирную область между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет два домена, аминоконцевой вариабельный домен (V_L) и карбоксиконцевой константный домен (C_L). Домен V_L нековалентно связывается с доменом V_H , тогда как домен C_L обычно ковалентно связан с доменом C_{H1} через дисульфидную связь. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663).

Некоторые участки в вариабельных доменах сильно различаются между разными антителами, т.е. являются "гипервариабельными". Эти гипервариабельные участки содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его специфической антигенной детерминанты. Гипервариабельность как в вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой цепи сосредоточена в трех сегментах, известных как определяющие комплементарности области (CDR) или гипервариабельные петли (HVL). CDR определены путем сравнения последовательностей в Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., тогда как HVL структурно определены в соответствии с трехмерной структурой вариабельного домена, как описано у Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917. Если эти два метода приводят к немного разным идентификациям CDR, предпочтительнее структурное определение. Как определено у Kabat, CDR-L1 расположен примерно на остатках 24-34, CDR-L2, примерно на остатках 50-56 и CDR-L3, примерно на остатках 89-97 в вариабельном домене легкой цепи; CDR-H1 располагается примерно на остатках 31-35, CDR-H2 примерно на остатках 50-65 и CDR-H3 примерно на остатках 95-102 в вариабельном домене тяжелой цепи.

Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой и легкой цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфичные для данного антитела.

Три CDR в каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными областями (FR), которые содержат последовательности, имеющие тенденцию быть менее вариабельными. От аминоконца вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей FR и CDR расположены в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Главным образом β -складчатая конфигурация FR сближает CDR в каждой из цепей друг с другом, а также с CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит вклад в сайт связывания антигена (см. Kabat et al., 1991, NIH № публ. 91-3242, том I, с. 647-669), хотя не все остатки CDR обязательно принимают непосредственное участие в связывании антигена.

Остатки FR и константные домены Ig не участвуют напрямую в связывании антигена, но способствуют связыванию антигена и/или опосредуют эффекторную функцию антитела. Считается, что некоторые остатки FR оказывают существенное влияние на связывание антигена по меньшей мере тремя способами: нековалентным связыванием непосредственно с эпитопом, взаимодействием с одним или несколькими остатками CDR и воздействием на поверхность раздела между тяжелой и легкой цепями. Константные домены не участвуют напрямую в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся

классов, каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного домена. Для сравнения, тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих отнесены к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных доменов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA далее подразделены на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов хорошо известны.

Термины "антитело", "антитело против CD40", "гуманизированное антитело против CD40" и "вариант гуманизированного антитела против CD40" используют в настоящем документе в самом широком смысле и конкретно охватывают моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, такие как переменные домены и другие части антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например, связывание с CD40.

Понятие "моноклональное антитело" (mAb) относится к антителу из популяции, по существу, гомогенных антител; т.е. отдельные антитела в этой популяции идентичны, за исключением встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны, они направлены против одной антигенной детерминанты, "эпитопа". Следовательно, модификатор "моноклональный" указывает, по существу, на гомогенную популяцию антител, направленных на идентичный эпитоп, и не может быть истолкован как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Следует понимать, что моноклональные антитела могут быть получены любым методом или методом, известным в данной области; включая, например, метод гибридом (Kohler et al., 1975, Nature, 256:495), или методы рекомбинантной ДНК, известные в данной области (см., например, патент США № 4,816,567), или способы выделения моноклональных рекомбинантно полученных с использованием библиотеки фаговых антител с использованием методик, описанных в Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628, и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597.

Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела одного вида (например, не относящегося к человеку млекопитающего, такого как мышь) и константных областей тяжелой и легкой цепей антитела другого вида (например, человека) и могут быть получены путем связывания последовательностей ДНК, кодирующих переменные области антитела первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК для константных областей антитела второго вида (например, человека) и трансформации хозяина экспрессионным вектором, содержащим связанные последовательности, позволяющие продуцировать химерное антитело.

Альтернативно, химерное антитело также может представлять собой антитело, в котором одна или несколько областей или доменов тяжелой и/или легкой цепи идентичны, гомологичны или являются вариантом соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулинов или из консенсусной последовательности или последовательности зародышевой линии. Химерные антитела могут включать фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность своего родительского антитела, например связывание с тем же эпитопом (см., например, патент США № 4,816,567; и Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855).

Термины "фрагмент антитела", "фрагмент антитела против CD40", "фрагмент гуманизированного антитела против CD40", "вариантный фрагмент гуманизированного антитела против CD40" относятся к части полноразмерного антитела против CD40, в котором сохраняется переменная область или функциональная способность, например специфическое связывание эпитопа CD40. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc фрагмент, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, мини-тело, диатело, образованное из фрагментов антител, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Полноразмерные антитела можно обрабатывать ферментами, такими как папаин или пепсин, для получения пригодных фрагментов антител. Расщепление папаином применяют для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антител, называемых фрагментами "Fab", каждый с одним антигенсвязывающим сайтом и остаточным фрагментом "Fc". Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и домен C_H1 тяжелой цепи. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием дополнительных остатков, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела на C-конце домена C_H1. Фрагменты F(ab')₂ антител представляют собой пары фрагментов Fab', связанных остатками цистеина в шарнирной области. Также известны другие химические соединения фрагментов антител.

Фрагмент "Fv" содержит полный сайт распознавания и связывания антигена, состоящий из димера одного переменного домена тяжелой и одного домена легкой цепей в тесной нековалентной связи. В этой конфигурации три CDR каждого переменного домена взаимодействуют, определяя сайт связывания антигена на поверхности димера V_H-V_L. В совокупности шесть CDR придают антителу антигенсва-

зываютую специфичность.

Фрагмент "одноцепочечного Fv" или "scFv" антитела представляет собой одноцепочечный вариант Fv, содержащий домены V_H и V_L антитела, где домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Одноцепочечный Fv способен распознавать и связывать антиген. Полипептид scFv может также необязательно содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами V_H и V_L, чтобы облегчить формирование желаемой трехмерной структуры для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, 1994, In *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315).

Другие распознаваемые фрагменты антител включают те, которые содержат пару тандемных сегментов Fd (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H2}), чтобы образовать пару антигенсвязывающих областей. Эти "линейные антитела" могут быть биспецифическими или моноспецифическими, как описано, например, в Zapata et al., 1995, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой конкретный тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который способен связываться с заранее определенным антигеном и который включает один или несколько FR, имеющих, по существу, аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и одну или несколько CDR, имеющих по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина. Эта нечеловеческая аминокислотная последовательность, которую часто называют "импортной" последовательностью, обычно берется из "импортного" домена антитела, в частности варибельного домена. В общем, гуманизированное антитело включает по меньшей мере CDR или HVL нечеловеческого антитела, вставленные между FR варибельного домена тяжелой или легкой цепи человека. В настоящем изобретении описаны специфические гуманизированные антитела против CD40, которые содержат CDR, полученные из мышинных моноклональных антител, показанных в табл. 3 и 4, вставленные между FR варибельных доменов тяжелой и легкой цепей последовательности зародышевой линии человека. Следует понимать, что некоторые остатки мышинного FR могут быть важны для функции гуманизированных антител, и поэтому некоторые остатки варибельных доменов тяжелой и легкой цепей последовательности зародышевой линии человека модифицированы так, чтобы они были такими же, как и в соответствующей последовательности мыши.

В другом аспекте гуманизированное антитело против CD40 содержит практически все по меньшей мере из одного, а обычно из двух варибельных доменов (таких как содержащиеся, например, во фрагментах Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), в которых все или практически все из CDR соответствуют CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и, в частности, в настоящем документе все из CDR представляют собой мышинные последовательности, как подробно описано в табл. 1-4 в настоящем документе ниже, и все, или практически все из FR являются таковыми из консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина или последовательности зародышевой линии. В другом аспекте гуманизированное антитело против CD40 также включает по меньшей мере часть Fc области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Обычно антитело будет содержать как легкую цепь, так и по меньшей мере варибельный домен тяжелой цепи. При необходимости, антитело также может включать один или несколько из C_{H1}, шарнирную область, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} участков тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело против CD40 можно выбрать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может быть константным доменом связывания комплемента, если желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, и изотипом обычно является IgG₁. Если такая цитотоксическая активность нежелательна, то константный домен может быть другого изотипа, например IgG₂. Альтернативное гуманизированное антитело против CD40 может содержать последовательности более чем из одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных доменов для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в компетенции обычного специалиста в данной области. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые представляют собой антитела IgG₁ и, более конкретно, представляют собой антитела IgG₁, в которых происходит нокаут эффекторных функций.

FR и CDR или HVL гуманизированного антитела против CD40 необязательно должны точно соответствовать родительским последовательностям. Например, один или несколько остатков в импортируемой CDR или HVL, или консенсусной последовательности, или последовательности FR зародышевой линии могут быть изменены (например, мутагенизированы) путем замены, вставки или делеции, так что полученный аминокислотный остаток больше не идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой родительской последовательности, но, тем не менее, антитело сохраняет функцию связывания с CD40. Такое изменение обычно не будет обширным и будет консервативным. Обычно по меньшей мере 75%, чаще по меньшей мере 90%, а наиболее часто больше 95%, или больше 98%, или больше 99% остатков гуманизированных антител будут соответствовать остаткам родительской консенсусной последовательности или последовательности FR зародышевой линии и импортированных последовательностей CDR.

Остатки иммуноглобулина, которые влияют на границу раздела между варибельными областями

тяжелой и легкой цепей ("граница раздела V_L - V_H "), представляют собой остатки, которые влияют на близость или ориентацию двух цепей относительно друг друга. Некоторые остатки, которые могут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, включают остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (с использованием системы нумерации, изложенной в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). В патенте США № 6,407,213 также обсуждается, что такие остатки, как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60, также могут участвовать в этом взаимодействии. Хотя эти остатки указаны только для человеческого IgG, они применимы для разных видов. Важные остатки антител, которые, как ожидается, будут участвовать в межцепочечных взаимодействиях, выбирают для замены в консенсусной последовательности.

Термины "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в каждом месте во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изоформа или структуры субъединицы, например варибельного домена иммуноглобулина человека. Консенсусная последовательность может быть основана на иммуноглобулинах определенного вида или многих видов. Под "консенсусной" последовательностью, структурой или антителом понимают консенсусную последовательность человека, как описано в определенных вариантах осуществления, и для обозначения аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом месте во всех иммуноглобулинах человека любого конкретного класса, изоформа или структуры субъединицы. Таким образом, консенсусная последовательность содержит аминокислотную последовательность, имеющую в каждом положении аминокислоту, которая присутствует в одном или нескольких известных иммуноглобулинах, но которая не может точно дублировать всю аминокислотную последовательность любого отдельного иммуноглобулина. Консенсусную последовательность варибельной области не получают из любого природного антитела или иммуноглобулина. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., и их варианты. FR консенсусных последовательностей тяжелой и легкой цепей и их вариантов обеспечивают полезные последовательности для получения гуманизированных антител против CD40. См., например, патенты США № 6,037,454 и 6,054,297.

Последовательности зародышевой линии человека естественным образом встречаются в человеческой популяции. Комбинация этих генов зародышевой линии создает разнообразие антител. Последовательности антител зародышевой линии для легкой цепи антитела происходят из консервативных ν -генов и j -генов зародышевой линии каппа или лямбда человека. Подобным образом последовательности тяжелых цепей происходят из ν -, d - и j -генов зародышевой линии (LeFranc, M.-P., и LeFranc, G., "The Immunoglobulin Facts Book", Academic Press, 2001).

В контексте настоящего описания термины "вариант", "вариант против CD40", "гуманизированный вариант против CD40" или "вариант гуманизированного антитела против CD40", каждый, относятся к гуманизированному антителу против CD40, имеющему по меньшей мере варибельную мышиную CDR тяжелой цепи из любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-4 или последовательность CDR легкой цепи мыши, полученную из мышиного моноклонального антитела, как показано в любой из последовательностей SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, и последовательностей FR, полученных из консенсусных последовательностей человека. Варианты включают те, которые содержат одну или несколько замен аминокислот в одном или обоих варибельных доменах легкой цепи или тяжелой цепи при условии, что изменение аминокислоты существенно не ухудшает связывание антитела с CD40. Типичные продуцируемые согласно настоящему изобретению гуманизированные антитела включают антитела, обозначенные как антитело А, антитело В и антитело С, и различные их последовательности тяжелой и легкой цепей показаны в SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 40.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты естественной среды антитела представляют собой те материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и могут быть ферментами, гормонами или другими белковыми или небелковыми растворенными веществами. В одном аспекте антитело будет очищено по меньшей мере до более 95% выделения антитела по массе.

Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, в которых оно продуцируется, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки, при которой удаляют рекомбинантный клеточный материал.

Термин "характеристики антитела" относится к факторам, которые способствуют распознаванию антителом антигена или эффективности антитела *in vivo*. Изменения в аминокислотной последовательности антитела могут влиять на свойства антитела, такие как фолдинг, и могут влиять на физические факторы, такие как начальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела от антигена (k_d), константа аффинности антитела к антигену (K_d), конформация антитела, стабильность белка и период полураспада антитела.

Термин "меченный эпитопом" в контексте настоящего документа относится к антителу против CD40, слитому с "меткой эпитопа".

"Метка эпитопа" представляет собой полипептид, имеющий достаточное количество аминокислот для обеспечения эпитопа продуцировать антитело, но сконструированный таким образом, чтобы он не мешал желаемой активности гуманизованного антитела против CD40. Метка эпитопа обычно достаточно уникальна, так что антитело, индуцированное против метки эпитопа, по существу не реагирует перекрестно с другими эпитопами. Подходящие полипептиды-метки обычно содержат по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и обычно содержат примерно 8-50 аминокислотных остатков или примерно 9-30 остатков. Примеры меток эпитопа и антитела, которое связывается с эпитопом, включают полипептид-метку flu HA и его антитело 12CA5 (Field et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165; метку с-мус и 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 антитела к ним (Evan et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616; и метку гликопротеина D (gD) вируса простого герпеса и его антитело (Paborsky et al., 1990, Protein Engineering, 3(6):547-553). В некоторых вариантах осуществления эпитопная метка представляет собой "эпитоп, связывающий рецептор реутилизации". В контексте настоящего описания понятие "эпитоп, связывающий рецептор реутилизации" относится к эпитопу области Fc молекулы IgG (такого как IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), которая отвечает за увеличение периода полураспада молекулы IgG в сыворотке крови *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть конъюгированы с цитотоксическим средством. Оно представляет собой любое вещество, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов (таких как I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ и Re¹⁸⁶), химиотерапевтических средств и токсинов, таких как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, а также их фрагменты. Такие цитотоксические средства могут быть связаны с гуманизованными антителами в соответствии с настоящим изобретением с использованием стандартных процедур и использованы, например, для лечения пациента, которому показана терапия антителом.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, используемое при лечении рака. Существует множество примеров химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с терапевтическими антителами в соответствии с настоящим изобретением. Примеры таких химиотерапевтических средств охватывают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотecin (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллестатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин, ауристатины, (включая аналоги монометилауристатина E и монометилауристатина F); дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-TMI); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хломафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрхлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин; трофосфамид, урациловая горчица; nitrosureas нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин gammaII и калихеамицин phiII, см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; динемидин, в том числе динемидин A; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеины эндииновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминиомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (адриамицин™) (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдтраксат; дефофамин; демоксолдин; диазиквон; эльфомитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон, митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозок-

сантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоная кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в особенности токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митабронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, штат Нью-Джерси) и доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин (Gemzar™); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин Навельбин™); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

В это определение также включены антигормональные средства, которые действуют, регулируя или подавляя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая Nolvadex™), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston™); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат (Megace™), эксеместан, форместан, фадрозол, ворозол (Rivisor™), летрозол (Femara™) и анастрозол (Arimidex™); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. Любое одно или несколько из этих средств могут быть конъюгированы с гуманизированными антителами в соответствии с настоящим изобретением для получения полезного терапевтического средства для лечения различных расстройств.

Антитела также могут быть конъюгированы с пролекарствами. "Пролекарство" представляет собой предшественник или производную форму фармацевтически активного вещества, которое менее цитотоксично для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и способно ферментативно активироваться или превращаться в более активную форму. См., например, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, p. 375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (изд.), p. 247-267, Humana Press. Подходящие пролекарства включают в себя, но не ограничиваются ими, фосфатсодержащие пролекарства, тиофосфатсодержащие пролекарства, сульфатсодержащие пролекарства, пептидсодержащие пролекарства, пролекарства, модифицированные D-аминокислотой, гликозилированные пролекарства, β-лактамысодержащие пролекарства, пролекарства, содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид, и пролекарства, содержащие необязательно замещенный фенилацетамид, 5-фторцитозин, и другие пролекарства 5-фторуридина, которые могут быть превращены в более активное, не содержащее цитотоксических веществ лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые могут быть преобразованы в форму пролекарства, включают, но не ограничиваются ими, те химиотерапевтические средства, которые описаны выше.

Для диагностических, а также терапевтических целей мониторинга антитела в соответствии с изобретением также могут быть конъюгированы с меткой, либо с одной меткой, либо с меткой и дополнительным вторым средством (пролекарством, химиотерапевтическим средством и т.п.). Метка, в отличие от других вторых средств, относится к средству, которое является детектируемым соединением или композицией, и она может быть конъюгирована прямо или косвенно с гуманизированным антителом, предлагаемым в настоящем изобретении. Метка может сама быть обнаруживаемой (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментативной метки, может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции, которые поддаются обнаружению. Меченые гуманизированные антитела против CD40 могут быть получены и использованы в различных применениях, включая диагностику *in vitro* и *in vivo*.

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены как часть липосомального препарата для того, чтобы повлиять на его доставку *in vivo*. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества. Липосомы пригодны для доставки млекопитающему соединению или состава, такого как гуманизированное антитело против CD40, описанное в настоящем документе, необязательно в сочетании или в комбинации с одним или несколькими фармацевтически активными средствами и/или метками. Компоненты липосомы обычно расположены в виде двухслойного образования, подобного расположению липидов в биологических мембранах.

В соответствии с настоящим изобретением некоторые аспекты относятся к выделенным нуклеиновым кислотам, которые кодируют один или несколько доменов гуманизированных антител, предлагаемых в настоящем изобретении. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицируется и отделяется по меньшей мере от одной загряз-

няющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, которая существует в естественных клетках.

В различных аспектах настоящего изобретения один или несколько доменов гуманизированных антител будут экспрессироваться рекомбинантно. Такая рекомбинантная экспрессия может использовать одну или несколько контрольных последовательностей, т.е. полинуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для использования в прокариотических клетках, включают, например, промотор, оператор и последовательности участка связывания рибосомы. Эукариотические контрольные последовательности включают, но не ограничиваются ими, промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Эти контрольные последовательности можно использовать для экспрессии и продукции гуманизированного антитела против CD40 в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Последовательность нуклеиновой кислоты является "функционально связанной", когда она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, предпоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторный лидер функционально связаны с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется как препротейн, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера - смежными и находятся в рамке считывания. Тем не менее энхансеры необязательно являются смежными. Связывание можно осуществить путем лигирования в удобные участки рестрикции. Если такие участки не существуют, то можно использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Используемые в контексте настоящего изобретения выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" применяют взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную рассматриваемую клетку и полученные из нее культуры без учета количества переносов.

Термин "млекопитающее" в целях лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, животных, используемых в спорте, или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.п. Предпочтительно млекопитающим является человек.

Нарушение" в контексте настоящего описания означает любое состояние, которое может быть улучшено после лечения гуманизированным антителом против CD40, описанным в настоящем документе. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые провоцируют у млекопитающего рассматриваемые заболевания. Неограничивающие примеры или расстройства, подлежащие лечению согласно настоящему изобретению, включают рак, гематологические злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, лейкемии и лимфоидные злокачественные новообразования, а также воспалительные, ангиогенные, аутоиммунные и иммунологические нарушения.

Понятия "рак" и "злокачественный" относятся или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз.

Используемый в настоящем документе термин "связанное с CD40 нарушение" или "связанное с CD40 заболевание" относится к состоянию, при котором отмечается модификация или элиминация клеток, экспрессирующих CD40. К ним относятся клетки, экспрессирующие CD40, демонстрирующие аномальную пролиферацию, или клетки, экспрессирующие CD40, которые связаны с раковым или злокачественным ростом. Более конкретные примеры рака, которые демонстрируют аномальную экспрессию антигена CD40, включают В-лимфобластоидные клетки, лимфому Беркитта, множественную миелому, Т-клеточные лимфомы, саркому Капоши, остеосаркому, эпидермальные и эндотелиальные опухоли, рак поджелудочной железы, легких, молочной железы, яичников, толстого кишечника, предстательной железы, головы и шеи, кожи (меланома), мочевого пузыря и почек. Такие расстройства включают, но не ограничиваются ими, лейкемии, лимфомы, включая В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; солидные опухоли, включая саркомы, такие как остеосаркома, саркома Юинга, злокачественная меланома, аденокарцинома, включая аденокарциному яичников, саркому Капоши/опухоль Капоши и плоскоклеточный рак.

Связанное с CD40 расстройство также включает заболевания и нарушения иммунной системы, такие как аутоиммунные нарушения и воспалительные нарушения. Такие состояния включают, но не ограничиваются ими, ревматоидный артрит (РА), системную красную волчанку (СКВ), склеродермию, синдром Шегрена, рассеянный склероз, псориаз, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), воспаление легких, астму и идиопатическую тромбоцитопеническую пур-

пуру (ИТП).

Фраза "останавливает рост" или "ингибитор роста" при использовании в настоящем документе относится к ингибированию роста или пролиферации клетки, особенно неопластического типа клеток, экспрессирующих антиген CD40. Таким образом, ингибирование роста, например, значительно снижает процент неопластических клеток в S-фазе.

Термин "внутривенная инфузия" относится к введению средства в вену пациента-животного или человека в течение периода времени, превышающего приблизительно 15 мин, обычно приблизительно от 30 до 90 мин.

Понятие "внутривенный болюс" или "внутривенно струйно" относится к введению лекарственного средства в вену животного или человека таким образом, что организм получает лекарственное средство приблизительно за 15 мин или меньше, обычно за 5 мин или меньше.

Термин "подкожное введение" относится к введению средства под кожу пациента-животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, продолжительной доставки из ёмкости для лекарственного средства. При защемлении или вытягивании кожи вверх и от подлежащей ткани может образоваться карман.

Термин "подкожная инфузия" относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, предпочтительно внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, путем относительно медленной, длительной доставки из ёмкости для лекарственного средства в течение периода времени, включая, но не ограничиваясь этим, 30 мин или меньше или 90 мин или меньше. Необязательно, инфузия может быть произведена путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного средства, имплантированного под кожу пациента-животного или человека, при этом насос доставляет заранее определенное количество лекарственного средства в течение заранее определенного периода времени, например 30 мин, 90 мин, или периода времени, охватывающего продолжительность схемы лечения.

Термин "подкожный болюс" относится к введению лекарственного средства под кожу пациента-животного или человека, где болюсная доставка лекарственного средства составляет менее чем приблизительно 15 мин; в другом аспекте менее 5 мин и в еще одном аспекте менее 60 с. В еще одном аспекте введение осуществляют внутри кармана между кожей и подлежащей тканью, где карман может быть создан путем защемления или оттягивания кожи вверх и от подлежащей ткани.

Термин "терапевтически эффективное количество" используют для обозначения количества активного средства, которое ослабляет или улучшает один или несколько симптомов заболевания, которое лечат. При этом именно такое количество имеет благоприятный исход для пациента, например, останавливает рост или вызывает уничтожение клетки. В одном аспекте терапевтически эффективное количество имеет апоптотическую активность или способно вызывать гибель клеток. В другом аспекте терапевтически эффективное количество относится к целевой концентрации в сыворотке, которая, как было показано, является эффективной, например, для замедления прогрессирования заболевания. Эффективность можно измерить обычными способами в зависимости от состояния, которое необходимо лечить. Например, при неопластических заболеваниях или нарушениях, характеризующихся клетками, экспрессирующими CD40, эффективность может быть измерена путем оценки времени до прогрессирования заболевания или определения скорости ответа.

Термины "лечение" и "терапия" и т.п., используемые в настоящем описании предназначены для включения терапевтических, а также профилактических или подавляющих мер в отношении заболевания или расстройства, приводящих к любому клинически желаемому или положительному эффекту, включая, но не ограничиваясь этим, смягчение или ослабление одного или нескольких симптомов, регресс, замедление или прекращение прогрессирования заболевания или нарушения. Таким образом, например, термин "лечение" включает в себя введение средства до или после появления симптома заболевания или расстройства, тем самым предотвращая или удаляя один или несколько признаков заболевания или нарушения. Кроме того, введение средства после появления и после развития клинических симптомов, когда введение влияет на клинические параметры заболевания или расстройства, такие как степень повреждения ткани или количество или степень метастазирования, независимо от того, приводит ли лечение к улучшению состояния или нет, заболевание включает в себя "лечение" или "терапию" в контексте настоящего описания. Более того, до тех пор, пока композиции в соответствии с изобретением либо сами по себе, либо в комбинации с другим терапевтическим средством смягчают или ослабляют по меньшей мере один симптом заболевания, которое лечат, по сравнению с этим симптомом в отсутствие использования композиции гуманизованного антитела против CD40, результат следует рассматривать как эффективное лечение основного заболевания, независимо от того, облегчены ли все симптомы расстройства или нет.

Термин "вкладыш в упаковку" используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в упаковки терапевтических продуктов для продажи, которые содержат информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно использования таких терапевтических продуктов.

Антитела.

В настоящем документе описаны и раскрыты гуманизированные антитела против CD40, а также композиции и промышленные изделия, содержащие одно или несколько гуманизированных антител против CD40 в соответствии с настоящим изобретением. Антитела в соответствии с настоящим изобретением также раскрыты в патенте США № 8,591,900 и WO 2011/123489, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Также описаны связывающие агенты, которые включают антигенсвязывающий фрагмент гуманизированного антитела против CD40. Гуманизированные антитела против CD40 и связывающие агенты могут останавливать рост клеток, вызывать удаление клеток, экспрессирующих CD40, или иным образом индуцировать или вызывать цитотоксический или цитостатический эффект на клетки-мишени. Гуманизированные антитела против CD40 и связывающие агенты можно использовать при лечении множества заболеваний или нарушений, характеризующихся пролиферацией клеток, экспрессирующих поверхностный антиген CD40. Гуманизированное антитело против CD40 и связывающий CD40 агент включают по меньшей мере часть, которая специфически распознает эпитоп CD40 (т.е. антигенсвязывающий фрагмент).

При первоначальной характеристике мышинные антитела отбирали на основе характеристики связывания CD40.

Из этих первоначальных исследований были отобраны мышинные антитела, которые имели следующие варибельные области тяжелой цепи, показанные в табл. 1, и варибельные области легкой цепи, показанные в табл. 2:

Таблица 1

Свинцовые мышинные антитела против CD40 -

Последовательности V_H.

2H11	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYVHVVVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDSKYAPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSLTS EDTAVYYCTTSY YVGTGYWGGQTTLTVSS (SEQ ID NO:1)
10F2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYIHVVVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKYDPKFQGGKATMTADTSSNTAYLHLSLTS EDTAVYYCTTSY YVGTGYWGGQTTLTVSS (SEQ ID NO:2)
19B10	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYVHVVVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKFAPKFQGGKATMTADTSSNTVYLHLSLTS EDTAVYYCTTSY YVGTGYWGGQTTLTVSS (SEQ ID NO:3)
20E2	EVQLVESGGGLVLPKPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAY ISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARQD GYRYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:4)

Таблица 2

Свинцовые мышинные антитела против CD40 -

Последовательности V_K

2H11	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLIWYST SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:5)
10F2	QIVLTQSPTIMASAPGEKVIITCSATSSVSYILWFQKPGTSPKLIWYST SNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:6)
19B10	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQKPGTSPKLIWYST SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRFTFYPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO:7)
20E2	DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLSGNQKNYLTWNHQQKPGQPP KLLIYWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTY PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

Последовательности каркасной области человека были выбраны для каждого из свинцовых антител мышцы на основе гомологии каркасной области, структуры CDR, консервативных канонических остатков, консервативных остатков упаковки интерфейса и других параметров.

CDR мышинных тяжелых цепей и легких цепей различных выбранных мышинных антител показаны в табл. 3 и 4 соответственно:

Таблица 3

Последовательности CDR тяжелой цепи

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

В указанном выше H-CDR1 используется последовательность с применением системы нумерации по Chothia (Al-Lazikani et al., (1997), JMB, 273, 927-948). Нумерация по Кабату для последовательностей обозначена жирным курсивом, а нумерация IMGT показана подчеркнутым текстом остатков в приведенной выше таблице для CDR1 и CDR2. Последовательностью H-CDR3 для каждого из 2H11, 10F2 и 19B10 является TTSYVVGTYGY (SEQ ID NO: 77), а для 20E2 является ARQDGYRYAMDY (SEQ ID NO: 78).

Таблица 4

Последовательности CDR легкой цепи

Название конструкции	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2H11	<u>SASSSVSYML</u> SEQ ID NO:18	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO:22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO:24
10F2	<u>SATSSVSYIL</u> SEQ ID NO:19	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO:22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO:24
19B10	<u>SASSSVSYML</u> SEQ ID NO:20	<u>STSNLAS</u> SEQ ID NO:22	<u>QORTFYPT</u> SEQ ID NO:24
20E2	<u>KSSQSLNLSGNOKNYLT</u> SEQ ID NO:21	<u>WTSTRES</u> SEQ ID NO:23	<u>QNDYTYPLT</u> SEQ ID NO:25

Опять же, система нумерации по Хотиа используется в табл. 4, где нумерация по Кабату для последовательностей обозначена жирным шрифтом, выделенным курсивом, а нумерация IMGT показана подчеркнутым текстом.

Fab, которые показали лучшее или равное связывание по сравнению с химерным родительским Fab, были отобраны для преобразования в IgG. Клоны из серии 20E2 были преобразованы в два разных формата: а) IgG4DM (двойной мутант) имеет две мутации в Fc/шарнирной области, Ser228Pro, который снижает образование полумолекул и Leu235Glu, который дополнительно снижает связывание FcγR; б) IgG₁-КО (нокаут эффекторных функций) имеет две мутации в области Fc, Leu234Ala и Leu235Ala, которые снижают эффекторную функцию, такую как FcγR и связывание комплемента. Оба формата IgG описаны в литературных источниках. В примере 1 более подробно описана гуманизация трех кандидатов. Результатом такой гуманизации стали гуманизированные последовательности антител, которые имеют последовательности тяжелой и легкой цепей, показанные ниже.

Идентичность	Последовательность	SEQ ID NO:
Антитело А (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNOKNYLTW</u> <u>HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTRVEIKR</u> TVAAPSVEI	26

	FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	
Антитело А (тяжелая цепь , IgG1K0)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Антитело А (тяжелая цепь , IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Антитело А (тяжелая цепь , IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEFGGPSVFLFPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK	29
Антитело А (тяжелая цепь , IgG1K0b)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSFDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH	30

	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK	
Антитело В (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEKVTINCKSSQSLLSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGGSGTDFI</u> <u>LTISLQAEADVAVYQCNDYTYPLTFGGGTVEIKRTVA</u> APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSLTLTSLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1κ)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPK SNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK	32
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPK SNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPK KDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK	33
Антитело В (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKTKTYICNVNHPK SNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEFGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK	34
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1κb)	<u>EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHPK SNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSLGK	35

Антитело С (легкая цепь)	<u>DIQMTQSPFSLASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQ</u> <u>QKPKGAPKLLIYSTNLAGVPSRFSGSGSDFTL</u> <u>TISLQPEDFATYYCQRTFYPTFFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1K0)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYCTTSYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPFVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYCTTSYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
Антитело С (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYCTTSYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGPFVFLFPPKPK DTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	39
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1K0b)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSEDVAVYCTTSYVGTGYGWGQGLTVTVSS</u> ASTKG PSVFFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPFVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может, например, блокировать пролиферацию или иным образом останавливать рост клетки или вызывать ее истощение, гибель или иным образом ее удаление, например, посредством связывания поверхностного антигена CD40. Например, при T- и B-клеточных злокачественных опухолях противоопухолевые эффекты (например, остановка роста с или без удаления клеток или апоптоза) часто возникают, когда злокачественные клетки подвергаются воздействию стимулов, которые приводят к активации нормальных лимфоцитов. Эта, вызванная активацией, остановка роста наблюдалась с помощью сигналов через рецепторы антигена или костимулирующие рецепторы (см., например, Ashwell et al., 1987, Science, 237:61; Bridges et al., 1987, J. Immunol. 139:4242; Page и Defranco, 1988, J. Immunol. 140:3717; и Beckwith et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:501). Стимуляция CD40 в результате специфического связывания либо антителом, либо растворимым лигандом ингибирует рост B-клеточной лимфомы (см., например, Funakoshi et al., 1994, Blood, 83:2787-2794). Средства, которые таким образом подавляют рост злокачественных клеток и которые направлены против поверхностного антигена CD40, являются примерами подходящих средств.

CD40-специфические средства включают антигенсвязывающий фрагмент гуманизированного антитела против CD40, который связывается с CD40 (например, человеческим CD40 или его вариантом). CD40-специфические средства и антитела могут быть необязательно конъюгированы или слиты с цитотоксическим или химиотерапевтическим средством. В аспектах, когда гуманизированное антитело связывается с поверхностным антигеном CD40 и вызывает истощение типов клеток, экспрессирующих CD40, связывание обычно характеризуется хомингом на клетку поверхностного антигена CD40 in vivo. Подходящие связывающие средства связывают антиген CD40 с достаточной аффинностью и/или авидностью, так что специфическое средство пригодно в качестве терапевтического средства путем специфического нацеливания на клетку, экспрессирующую антиген.

В некоторых аспектах гуманизированное антитело снижает связывание лиганда CD40 с CD40 по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 75%,

или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против CD40, включая их антигенсвязывающие фрагменты, такие как переменные домены тяжелой и легкой цепей, содержат аминокислотную последовательность остатков, полученных из CDR антитела A (последовательность тяжелой цепи = SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO:30; последовательность легкой цепи = SEQ ID NO: 26), антитело B (последовательность тяжелой цепи = SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35; последовательность легкой цепи = SEQ ID NO: 31) и антитело C (последовательность тяжелой цепи = SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40; последовательность легкой цепи = SEQ ID NO: 36), как описано в настоящем документе выше, и аминокислотные остатки, полученные из каркасных областей иммуноглобулина человека. Гуманизированные антитела против CD40 необязательно включают специфические аминокислотные замены в консенсусных или каркасных областях зародышевой линии.

Специфическая замена аминокислотных остатков в этих положениях каркаса может улучшить различные аспекты характеристик антитела, включая аффинность связывания и/или стабильность, по сравнению с тем, что продемонстрировано в гуманизированных антителах, образованных "прямой заменой" CDR или HVL в каркасные области зародышевой линии человека, как показано в примерах ниже.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение описывает другие моноклональные антитела с последовательностями тяжелой цепи (V_H), которые представлены в SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 4 и последовательностями легкой цепи (V_L), которые представлены в SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8 (см. табл. 1 и 2 выше). Последовательность CDR этих мышинных антител показана в табл. 3 и 4, размещение таких CDR в FR консенсусных переменных доменов тяжелой и легкой цепей человека даст полезные гуманизированные антитела в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых конкретных вариантах осуществления гуманизированные антитела против CD40, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере переменный домен тяжелой или легкой цепи, содержащий CDR или HVL мышинных моноклональных антител, как показано в табл. 1-4, выше и FR переменных доменов тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека. В примерных вариантах осуществления гуманизированные антитела, созданные в соответствии с изобретением, представляют собой антитело A, антитело B и антитело C, а различные их последовательности тяжелой и легкой цепей показаны в SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 40.

В отдельных вариантах осуществления предусмотрены антитела, которые имеют последовательность тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30 в комбинации с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 26. Альтернативные антитела включают антитела, которые имеют последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35 в комбинации с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 31. В еще дополнительных вариантах осуществления представлены гуманизированные антитела, которые имеют последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40 в комбинации с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 36.

CDR этих последовательностей показаны в табл. 3 и 4. В отдельных вариантах осуществления предполагается, что химерные антитела с переключенными областями CDR (т.е., например, переключение одного или двух CDR антитела A с аналогичным CDR антитела C) между этими примерными иммуноглобулинами могут давать полезные антитела.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против CD40 представляет собой фрагмент антитела. Выше, в целом, были рассмотрены различные фрагменты антител и существуют методы, которые были разработаны для получения фрагментов антител. Фрагменты могут быть получены путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117; и Brennan et al., 1985, *Science*, 229:81). Альтернативно, фрагменты могут быть получены непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов $F(ab')_2$ (см., например, Carter et al., 1992, *Bio/Technology*, 10:163-167). С помощью другого подхода фрагменты $F(ab')_2$ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методы получения фрагментов антител будут очевидны квалифицированному практикующему специалисту.

Некоторые варианты осуществления включают фрагмент $F(ab')_2$ гуманизированного антитела против CD40, содержащий последовательность тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30 в сочетании с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 26. Альтернативные антитела включают антитела, которые имеют последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35 в комбинации с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 31. В еще дополнительных вариантах осуществления представлены гуманизированные антитела, которые имеют последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40 в комбинации с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 36. Такие варианты реализации могут включать интактное антитело, содержащее такой $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела включает константную об-

ласть, которая опосредует эффекторную функцию. Константная область может обеспечивать ответы антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) против клеток-мишеней, экспрессирующих CD40. Эффекторный домен(ы) могут быть, например, областью Fc молекулы Ig. Обычно связывающий CD40 агент привлекает и/или активирует цитотоксические лейкоциты (например, естественные клетки-киллеры (NK), фагоцитотические клетки (например, макрофаги) и/или компоненты комплемента сыворотки).

Эффекторный домен антитела может происходить от любого подходящего вида и изотипа позвоночных животных. Изотипы от разных видов животных различаются способностью опосредовать эффекторные функции. Например, способность человеческого иммуноглобулина опосредовать CDC и ADCC/ADCP обычно находится в следующем порядке:

$IgM \approx IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 > IgG_4$ и $IgG_1 \approx IgG_3 > IgG_2 / IgM / IgG_4$ соответственно.

Мышиные иммуноглобулины опосредуют CDC и ADCC/ADCP, как правило, в следующем порядке: мышиные $IgM \approx IgG_3 >> IgG_{2b} > IgG_{2a} >> IgG_1$ и $IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG_1 >> IgG_3$ соответственно.

В другом примере мышиный IgG_{2a} опосредует ADCC, тогда как мышиные IgG_{2a} и IgM опосредуют CDC.

Модификации антитела.

Гуманизированные антитела против CD40 и средства могут включать модификации гуманизированного антитела против CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, может быть желательно модифицировать антитело в отношении эффекторной функции, чтобы повысить эффективность антитела при лечении рака. Одной из таких модификаций является введение остатка(ов) цистеина в область Fc, что позволяет образовывать межцепочечные дисульфидные связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или повышенной опосредованной комплементом гибели клеток и/или антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). См., например, Caron et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195; и Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. Гомодимерные антитела, обладающие повышенной противоопухолевой активностью, также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных сшивающих агентов, как описано у Wolff et al., 1993, Cancer Research, 53:2560-2565. Альтернативно, антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы оно содержало двойные области Fc, усиливая лизис комплемента и потенциальные возможности ADCC антитела. См. Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230.

Антитела с улучшенной способностью поддерживать ADCC были получены путем модификации паттерна гликозилирования их Fc области. Это возможно, поскольку гликозилирование антител по остатку аспарагина, N297, в домене C_{H2} участвует во взаимодействии между рецепторами IgG и Fcγ, что является предпосылкой для ADCC. Линии клеток-хозяев были сконструированы для экспрессии антител с измененным гликозилированием, таким как повышенное биссекционирование N-ацетилглюкозамина или пониженное содержание фукозы. Уменьшение количества фукозы обеспечивает большее усиление активности ADCC, чем увеличение присутствия разделенного пополам N-ацетилглюкозамина. Более того, усиление ADCC антителами с низким содержанием фукозы не зависит от полиморфизма FcγRIIIa V/F.

Изменение аминокислотной последовательности области Fc антител является альтернативой инженерии гликозилирования для усиления ADCC. Сайт связывания человеческого IgG₁ для рецепторов Fcγ был определен с помощью обширного мутационного анализа. Это привело к созданию гуманизированных антител IgG₁ с мутациями Fc, которые увеличивают аффинность связывания с FcγRIIIa и усиливают ADCC in vitro. Кроме того, были получены варианты Fc с множеством различных вариантов связывающих свойств, например с улучшенным связыванием со специфическими рецепторами FcγR с неизменным или уменьшенным связыванием с другими рецепторами FcγR.

Другой аспект включает иммуноконъюгаты, содержащие гуманизированное антитело или его фрагменты, конъюгированные с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконьюгат).

Выше были описаны химиотерапевтические средства, пригодные для получения таких иммуноконьюгатов. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы для образования полезных иммуноконьюгатов, включают дифтерийную А-цепь, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, трикотецены и т.п. Для получения радиоактивно конъюгированных гуманизированных антител против CD40 доступны различные радионуклиды. Примеры включают в себя ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re.

Конъюгаты гуманизированного антитела против CD40 и цитотоксического или химиотерапевтиче-

ского средства могут быть получены известными методами с использованием различных бифункциональных белков-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутарельдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al., 1987, Science, 238:1098. Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилтриаминапентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим средством для конъюгации радионуклеотида с антителом. Конъюгаты также могут быть образованы с расщепляемым линкером.

В другом варианте осуществления антитело может быть конъюгировано с "рецептором" (таким как стрептавидин) для использования в предварительном нацеливании на опухоль. В этой процедуре конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту с последующим удалением несвязавшегося конъюгата из кровотока с использованием очищающего средства и затем введением "лиганда", который селективно связывает рецептор (например, авидин), причем лиганд представляет собой конъюгированный с цитотоксическим агентом (например, радионуклидом).

Описанные в настоящем документе гуманизированные антитела против CD40 также могут быть составлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описанные в Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030; и патенты США № 4,485,045 и 4,544,545. Липосомы, имеющие увеличенное время циркуляции, раскрыты, например, в патенте США № 5,013,556.

Особенно пригодные липосомы могут быть получены методом испарения с обращенной фазой с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и производное и ПЭГ-derivatизированный фосфатидилэтанолламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра. Фрагменты Fab' раскрытого в настоящем документе антитела можно конъюгировать с липосомами, как описано у Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288 посредством реакции дисульфидного обмена. Необязательно в липосомах содержится химиотерапевтическое средство (такое как доксорубин). См., например, Gabizon et al., 1989, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484.

Антитела, описанные и раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы в процедурах ADEPT (антитело-направленная ферментная пролекарственная терапия) путем конъюгирования антитела с ферментом, активирующим пролекарство, который превращает пролекарство (например, пептидил химиотерапевтическое средство) в активное противораковое лекарственное средство. См., например, WO 81/01145, WO 88/07378 и патент США № 4,975,278. Ферментный компонент иммуноконъюгата, пригодный для ADEPT представляет собой фермент, способный воздействовать на пролекарство таким образом, чтобы преобразовать его в его более активную цитотоксическую форму. Конкретные ферменты, которые можно использовать в ADEPT, включают, без ограничений указанными, алкалинфосфатазу, способную превращать фосфатсодержащие пролекарства в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, способную превращать сульфатсодержащие пролекарства в свободные в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, способную превращать нетоксичный 5-фторцитозин противораковое лекарственное средство, 5-фторурацил; протеазы, такие как претеаза serratia, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины B и L), для превращения пептидсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы для превращения пролекарств, содержащих D-аминокислотные заместители; ферменты, расщепляющие углеводы, такие как β-галактозидаза и нейраминидаза для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β-лактамаза для превращения лекарственных средств, derivatизированных β-лактамами в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, для превращения лекарственных средств, derivatизированных у их аминных атомов азота с феноксиацетильными или фенилацетильными группами соответственно, в свободные лекарственные средства. Альтернативно, антитела с ферментативной активностью ("абзимы") могут быть использованы для превращения пролекарств в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, 1987, Nature, 328:457-458). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены известными способами, для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток, например, путем ковалентного связывания фермента с гуманизированным антителом против CD40/гетеробифункциональными сшивающими реагентами, описанными выше. В качестве альтернативы слитые белки, содержащие по меньшей мере антигенсвязывающую область описанного в настоящем документе антитела, связанную по меньшей мере с функционально активной частью фермента, как описано выше, могут быть сконструированы с использованием методов рекомбинантной ДНК (см., например, Neuberger et al., 1984, Nature, 312:604-608).

В некоторых вариантах осуществления может быть желательно использовать фрагмент гуманизи-

рованного антитела против CD40, а не интактное антитело, например, для увеличения проникновения в опухоль. Может быть целесообразно модифицировать фрагмент антитела, чтобы увеличить его период полураспада в сыворотке. Это может быть достигнуто, например, путем включения эпитопа, связывающего рецептор спасения, во фрагмент антитела. В одном способе соответствующий участок фрагмента антитела может быть изменен (например, мутирован) или эпитоп может быть включен в пептидную метку, которая затем сливается с фрагментом антитела на любом конце или в середине, например, посредством синтеза ДНК или пептидов. См., например, WO 96/32478.

В другие варианты осуществления также включены ковалентные модификации гуманизированного антитела против CD40. Ковалентные модификации включают модификацию цистеинильных остатков, гистидильных остатков, лизинильных и аминоконцевых остатков, аргинильных остатков, тирозильных остатков, боковых карбоксильных групп (аспартил или глутамил), глутаминильных и аспарагинильных остатков или сериловых или треонинильных остатков. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом. Такие модификации могут быть сделаны путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления антитела, если применимо. Другие типы ковалентных модификаций антитела могут быть введены в молекулу путем взаимодействия целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или амино- или карбоксиконцевыми остатками.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих в антител, может быть выполнено химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано у Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и у Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на антителах может быть достигнуто с помощью использования множества эндо- и экзогликозидаз, как описано у Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350.

Другой тип полезной ковалентной модификации включает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксипалкиленами, способом, изложенным в одном или нескольких патентах США № 4,640,835, 4,496,689, 4,301,144, 4,670,417, 4,791,192 и 4,179,337.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности.

Варианты аминокислотной последовательности антитела против CD40 могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в ДНК антитела против CD40 или путем синтеза пептидов. Такие варианты включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител против CD40 из примеров, приведенных в настоящем описании. Любая комбинация делеций, вставок и замен производится для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут менять посттрансляционные процессы гуманизированного или вариантного антитела против CD40, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Пригодный способ идентификации определенных остатков или областей антитела против CD40, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется "мутагенезом аланинового сканирования", как описано у Cunningham and Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). В данном случае идентифицируют остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (обычно аланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном CD40. Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняются путем введения дополнительных или других вариантов в сайты замены или вместо них. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности предопределен, природа мутации как таковая необязательно должна быть предопределена. Например, для анализа эффективности мутации в данном сайте проводится аланиновое сканирование или случайный мутагенез по целевому кодону или области, и экспрессированные варианты антитела против CD40 подвергаются скринингу на предмет желаемой активности.

Вставки аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния в диапазоне длины от одного остатка до полипептидов, содержащих 100 или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело против CD40, слитое с эпитопной меткой. Другие инсерционные варианты молекулы антитела против CD40 включают слияние с N- или C-концом антитела против CD40 фермента или полипептида, который увеличивает время полужизни антитела в сыворотке.

Другой тип варианта представляет собой вариант с заменой аминокислот. В этих вариантах удален по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела против CD40, и на его место вставлен другой остаток. Сайты, представляющие наибольший интерес для замещающего мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR. Консервативные замены показаны в табл. 5 под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда могут быть внесены более существенные изменения, названные "Примерные замены", или, как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, продук-

ты скринированы.

Исходный остаток	Примерные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	ile; norleucine; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe; trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleucine;	leu

В химии белков общепризнанно, что биологические свойства антитела могут быть достигнуты путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (в) основной части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы, исходя из общих свойств боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислотные: asp, glu;
- (4) основные: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании надлежащей конформации гуманизованного или варианта антитела против CD40, также может быть заменен, как правило, серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы, предотвращения аберрантного перекрестного сшивания или обеспечения установленных точек конъюгации с цитотоксическим или цитостатическим соединением. И наоборот, цистеиновая связь(и) могут быть добавлены к антителу для повышения его стабильности (особенно, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

Тип варианта замены включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизованного или человеческого антитела). Как правило, полученные варианты, выбранные для дальнейшей разработки, будут иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого они получены. Удобным способом создания таких вариантов замены является созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутируют для генерирования всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител отбираются моновалентным образом из частиц ничтожного фага в виде слияния с продуктом гена III M13, упакованным в каждой частице. Затем варианты, представленные на фаге, подвергаются скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Чтобы идентифицировать сайты-кандидаты гипервариабельной области для модификации, может быть выполнен мутагенез с аланиновым сканированием для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или в дополнение, может быть полезно проанализиро-

вать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между антителом и CD40 человека. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену согласно методикам, разработанным в настоящем изобретении. После создания таких вариантов панель вариантов подвергается скринингу, как описано в настоящем документе, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный паттерн гликозилирования антитела. Под "изменением" подразумевается делеция одного или нескольких углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в антителе.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательно модифицировать антитела в соответствии с изобретением для добавления сайтов гликозилирования. Гликозилирование антител обычно бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. Таким образом, для гликозилирования данного белка, например антитела, аминокислотная последовательность белка конструируется так, чтобы содержать одну или несколько из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также может быть выполнено путем добавления или замены одним или несколькими остатками серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют варианты аминокислотной последовательности антитела против CD40, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотидопосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза ПЦР и касетного мутагенеза более ранней полученной вариантной или невариантной версии антитела против CD40.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы.

Другие варианты осуществления охватывают выделенные полинуклеотиды, которые содержат последовательность, кодирующую гуманизованное антитело против CD40, векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотиды, и рекомбинантные методы получения гуманизованного антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желаемую форму антитела против CD40, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40. Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 36.

В одном аспекте выделенная полинуклеотидная последовательность(и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющий варибельный домен тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

Полинуклеотид(ы), который содержит последовательность, кодирующую гуманизованное антитело против CD40 или его фрагмент или цепь, может быть слит с одной или несколькими регуляторными или контрольными последовательностями, как известно в данной области, и может содержаться в подходящих векторах экспрессии или клетке-хозяине, как известно из уровня техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих варибельные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо слита с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как констант-

ный домен человека, что позволяет продуцировать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды или их части могут быть слиты вместе, обеспечивая матрицу для продукции одноцепочечного антитела.

Для рекомбинантного получения полинуклеотид, кодирующий антитело, вставляют в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Доступно множество подходящих векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются ими, одно или несколько из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Гуманизированные антитела против CD40 также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность обычно распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальную последовательность гуманизированного антитела против CD40, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротейн, термостабильные лидеры энтеротоксина II и т.п. Для дрожжевой секреции нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из дрожжевого альфа-фактора инвертазы (включая лидеры α -фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *S. albicans* или сигнала, описанного в WO 90/13646. В клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей гуманизированное антитело против CD40.

Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или нескольких выбранных клетках-хозяевах. Обычно в клонирующих векторах эта последовательность является последовательностью, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, ориджин плазмиды 2- ν подходит для дрожжей, а различные вирусные ориджины (SV40, полиома, аденовирус, VSV и BPV) могут быть использованы для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент ориджина репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (ориджин SV40 обычно может использоваться только потому, что он содержит ранний промотор).

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген, кодирующий селективный маркер, для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селективируемые маркерные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или, альтернативно, являются ауксотрофными дефицитами компонента, или в других альтернативных вариантах поставляют определенные питательные вещества, которые не присутствуют в сложных средах, например ген, кодирующий D-аланин рацемазу для *Bacilli*.

В одном примере схемы отбора используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственным средствам и таким образом, выживают в режиме отбора. Примеры такого доминирующего отбора включают лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гиромоцин. Обычными селективируемыми маркерами для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные принимать нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело против CD40, такие как DHFR (дигидрофолатредуктазу), тимидинкиназу, металлотионеин-I и -II (такие как гены металлотионеина приматов), аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т.п. Клетки, трансформированные геном отбора DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. При использовании DHFR дикого типа подходящей клеткой-хозяином является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, DG44).

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR) трансформированы или котрансформированы последовательностями ДНК, кодирующими антитело против CD40, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей агент отбора для маркера отбора, такого как аминокликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См., например, патент США № 4,965,199.

Если рекомбинантная продукция осуществляется в дрожжевой клетке в качестве клетки-хозяина, то ген TRP1, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature, 282:39), можно

использовать в качестве маркера отбора. Ген TRP1 обеспечивает маркер отбора для мутантного штамма дрожжей, лишенного способности расти в триптофанае, например ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics, 85:12). Присутствие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина затем обеспечивает эффективную среду для обнаружения трансформации по росту в отсутствие триптофана. Точно так же штаммы дрожжей с дефицитом *Leu2p*, такие как ATCC 20,622 и 38,626, дополняются известными плазмидами, несущими ген LEU2.

Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды pKD1 размером 1,6 мкм, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluuyveromyces*. Альтернативно, система экспрессии для крупномасштабного продуцирования рекомбинантного химозина тельника была описана для *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology, 8:135). Также были описаны стабильные мультикопийные экспрессионные векторы для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина промышленными штаммами *Kluuyveromyces* (Fleeg et al., 1991, Bio/Technology, 9:968-975).

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против CD40 или его полипептидную цепь. Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор *rhoA*, системы промоторов β -лактамазы и лактозы, щелочную фосфатазу, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Также подходят другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгамо (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей гуманизованное антитело против CD40.

Известно много эукариотических промоторных последовательностей. Практически все эукариотические гены имеют богатую АТ область, расположенную примерно на 25-30 оснований выше сайта, где начинается транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная на 70-80 оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходящим образом вставляются в эукариотические векторы экспрессии.

Примеры подходящих промотирующих последовательностей для использования с дрожжевыми хозяевами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфат-изомераза, фосфоглюкозо-изомераза и глюкокиназа.

Индукцибельные промоторы обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что транскрипция регулируется условиями роста. К ним относятся промоторные области дрожжей для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, производных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для использования в экспрессии дрожжей дополнительно описаны в EP 73657. Усилители дрожжей также преимущественно используются с промоторами дрожжей.

Транскрипция гуманизованного антитела против CD40 из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40), из промоторов гетерологичных млекопитающих, например промотора актина или промотора иммуноглобулина, или из промоторов теплового шока при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранний и поздний промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит ориджин репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у млекопитающих-хозяев с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора раскрыта в патентах США № 4,419,446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4,601,978. См. также Reyes et al., 1982, Nature, 297:598-601, раскрывающую экспрессию кДНК человеческого р-интерферона в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Другим полезным элементом, который можно использовать в рекомбинантном векторе экспрессии, является энхансерная последовательность, которую используют для увеличения транскрипции ДНК, кодирующей гуманизованное антитело против CD40, высшими эукариотами. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей генов млекопитающих (например, глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Тем не менее обычно используют энхансер вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне ориджина репликации (100-270 пар

оснований), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне ориджина репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, 1982, Nature, 297:17-18 для описания усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей гуманизованное антитело против CD40, но предпочтительно он расположен в сайте 5' от промотора.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибки, насекомые, растения, животные, люди или нуклеированные клетки из других многоклеточных организмов)? также могут содержать последовательности, необходимые для прекращения транскрипции и стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело против CD40. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и раскрытый в ней вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела против CD40 можно экспрессировать с использованием системы CHEF. (См., например, патент США № 5,888,809; описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки).

Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данном случае являются прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамтрицательные или грамположительные организмы, например Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например Salmonella typhimurium, Serratia, например Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41 P disclosed in DD 266,710 published Apr. 12, 1989), Pseudomonas, такие как P. aeruginosa и Streptomyces. Одним из предпочтительных хозяев для клонирования E. coli является E. coli 294 (ATCC 31,446), хотя подходят другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537) и E. coli W3110 (ATCC 27,325). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии гуманизованных векторов, кодирующих антитело против CD40, являются эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи. Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако в данном случае доступны и полезны ряд других родов, видов и штаммов обычно, такие как Schizosaccharomyces pombe; хозяева Kluyveromyces, такие как, например, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilum (ATCC 36,906), K. thermotolerans и K. marxianus; уагговия (EP 402226); Pichia pastors (EP 183070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, такие как Schwanniomyces occidentalis; и нитчатые грибы, такие как, например, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и хозяева Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного гуманизованного антитела против CD40 происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых, включая, например, многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие разрешающие клетки-хозяева насекомых от хозяев, таких как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (плодовая мушка) и Bombyx mori (шелковичный червь). Общеизвестными являются разнообразные вирусные штаммы для трансфекции, например вариант L-1 Autographa californica NPV и штамм Bm-5 Bombyx mori NPV, и такие вирусы могут быть использованы, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

Культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака также могут быть использованы в качестве хозяев.

В другом аспекте экспрессия гуманизованного антитела против CD40 осуществляется в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало рутинной процедурой, и методы широко доступны. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная посредством SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36:59), клетки почек детенышей хомячка (ВНК, ATCC CCL 10), клетки яичников китайского хомячка/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216; например, DG44), клетки сертолы мыши (ТМ4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), клетки почек обезьян (CV1, ATCC CCL 70), клетки почек африканских зеленых мартышек (VERO-76, ATCC CRL-1587), клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL 51), клетки TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68), клетки MRC 5, клетки FS4 и линии гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для

продуцирования гуманизированных антител против CD40 и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в соответствии с требованиями для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для получения гуманизированного антитела против CD40, описанного в настоящем документе, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), минимальная необходимая среда (MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), и среда Игла, модифицированная по Дульбекко ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.), пригодны для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в одном или нескольких из литературных источников Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58:44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102:255, патенты США № 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, 5,122,469, WO 90/103430 и WO 87/00195, может быть использована в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть при необходимости дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Другие добавки также могут быть включены в подходящих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, которые ранее использовали с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области стандартного уровня подготовки.

При использовании рекомбинантных методов антитело можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, клетки могут быть разрушены для высвобождения белка в качестве первой стадии. Частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты могут быть удалены, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. У Carter et al., 1992, Bio/Technology, 10:163-167 описана процедура выделения антител, которые секретированы в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Остатки клеток можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретировано в среду, супернатанты таких экспрессионных систем обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например устройства ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ. Для выделения антитела из клетки-хозяина можно использовать различные методы.

Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена с использованием, например, хроматографии с гидроксилапатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, при этом типичным методом очистки является аффинная хроматография. Пригодность протеина А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, которые основаны на тяжелых цепях гамма-1, гамма-2 или гамма-4 человека (см., например, Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для гамма-3 человека (см., например, Guss et al., 1986, EMBO J. 5:1567-1575). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем может быть достигнуто с агарозой. Если антитело содержит домен C_H3, смола Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) может быть использована для очистки. Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (хроматография на анионной или катионообменной смоле), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от антитела, которое необходимо выделить.

После любой предварительной стадии(й) очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с использованием элюирующего буфера при pH примерно 2,5-4,5, обычно проводимой при низких концентрациях соли (например, от около 0-0,25 М соли).

Также включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой, средней и высокой жесткости, как определено в настоящем документе, со всей или частью (например, частью, кодирующей варируемую область) нуклеотидной последовательности, представленной изолированной полинуклеотидной последовательностью(ми), которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий варируемый домен тяжелой цепи и варируемую область легкой цепи, содержащую аминокис-

лотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты обычно имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична последовательности части или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид против CD40 (например, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи) или его комплемент. Гибридирующиеся нуклеиновые кислоты описанного в настоящем документе типа можно использовать, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например праймера ПЦР, или диагностического зонда.

Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, включая последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40. Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, включая последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 5-8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 36.

В одном аспекте выделенная полинуклеотидная последовательность(и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющий переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, каждый включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности антитела или фрагмента антитела, имеющего переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

В другом аспекте изобретение относится к полинуклеотиду в варианте осуществления, описанном непосредственно выше, где переменный домен тяжелой цепи и переменная область легкой цепи кодируемого антитела или фрагмента антитела включают аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности антитела или фрагмента антитела, имеющего переменный домен тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности, в одном варианте осуществления SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31, соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно и в другом варианте осуществления SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

Используемые в настоящем документе термины "идентичный" или "процент идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Чтобы определить процент идентичности, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновой кислоты могут быть введены пробелы для оптимального

выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Когда положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = $\frac{\# \text{ количество идентичных положений}}{\text{общее количество } \# \text{ положений}}$ (например, перекрывающихся положений) $\times 100$). В некоторых вариантах осуществления две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после того, как в последовательности вводят пробелы, в зависимости от ситуации (например, исключая дополнительную последовательность, выходящую за пределы сравниваемых последовательностей). Например, при сравнении последовательностей вариабельной области последовательности лидерного и/или константного домена не рассматриваются. Для сравнения последовательностей между двумя последовательностями "соответствующая" CDR относится к CDR в одном и том же месте в обеих последовательностях (например, CDR-H1 каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, измененный как у Karlin и Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST по Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиски нуклеотидов BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей интересующий белок. Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных соответствующему белку. Чтобы получить выравнивания с пробелами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано у Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. В качестве альтернативы PSI-Blast можно использовать для выполнения повторного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину пробела, равный 12 и штраф за пробел, равный 4. Дополнительные алгоритмы анализа последовательностей известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; и FASTA описанные в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-8. В FASTA ktpur представляет собой опцию управления, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktpur=2, то аналогичные области в двух сравниваемых последовательностях обнаруживаются путем просмотра пар выровненных остатков; если ktpur=1, то проверяют одноуровневые аминокислоты, ktpur может быть установлен на 2 или 1 для последовательностей белков или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. По умолчанию, если ktpur не указан, это 2 для белков и 6 для ДНК. В качестве альтернативы выравнивание белковой последовательности можно проводить с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано у Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Нетерапевтическое применение.

Описанные в настоящем документе антитела можно использовать в качестве средств для аффинной очистки. В этом процессе антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола с белком А, с использованием методов, хорошо известных в данной области. Иммобилизованное антитело контактирует с образцом, содержащим белок CD40 (или его фрагмент), который необходимо очистить, и после этого носитель промывают подходящим растворителем, который удаляет практически весь материал в образце, кроме белка CD40, который связан с иммобилизованным антителом. Наконец, носитель промывают другим подходящим растворителем, который высвобождает белок CD40 из антитела.

Гуманизированные антитела против CD40 также применимы в диагностических анализах для обнаружения и/или количественного определения белка CD40, например для определения экспрессии CD40 в конкретных клетках, тканях или сыворотке крови.

В некоторых вариантах осуществления, например в диагностических целях, будет полезно помечать антитело поддающимся обнаружению детектируемым фрагментом. Доступны многочисленные поддающиеся обнаружению метки, включая радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки ферментного субстрата и т.п. Метка может быть косвенно конъюгирована с антителом с использованием различных известных методов. Например, антитело можно конъюгировать с биотином, и любая из трех широких категорий меток, упомянутых выше, может быть конъюгирована с авидином, или наоборот. Биотин из-

бирательно связывается с авидином, и, таким образом, метка может быть конъюгирована с антителом косвенным образом. В качестве альтернативы для достижения непрямо конъюгации метки с антителом, антитело можно конъюгировать с небольшим гаптеном (таким как дигоксин) и один из различных типов меток, упомянутых выше, конъюгируют с антителом против гаптена (например, антителом против дигоксина). Таким образом, может быть достигнута непрямо конъюгация метки с антителом.

Примеры меток радиоизотопов включают ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно пометить радиоизотопом, используя методы, описанные, например, в *Current Protocols in Immunology*, vols. 1 и 2, 1991, Coligen et al., Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Радиоактивность можно измерить, например, с помощью сцинтилляционного счета.

Примеры флуоресцентных меток включают метки, полученные из хелатов редкоземельных элементов (хелаты европия), или доступный флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, лиссамин, фикоэритрин и техасский красный. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом известными методами, такими как, например, раскрытые в *Current Protocols in Immunology*, выше, например. Флуоресценцию можно количественно оценить с помощью флуориметра.

Существуют различные хорошо охарактеризованные ферментно-субстратные метки, известные в данной области (см., например, патент США № 4,275,149 для обзора). Фермент обычно катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно измерить с помощью различных методов. Например, изменение может представлять собой изменение цвета субстрата, которое можно измерить спектрофотометрически. В качестве альтернативы фермент может изменять флуоресценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методы количественной оценки изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно возбужденным в результате химической реакции и может затем излучать свет, который можно измерить, например, с помощью хемилюминометра, или передавать энергию флуоресцентному акцептору.

Примеры ферментных меток включают люциферазы, такие как люцифераза светлячка и бактериальная люцифераза (патент США № 4,737,456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, малатдегидрогеназа, уреазы, пероксидазы, такая как пероксидаза хрена (HRPO), щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамилаза, лизоцим, сахаридоксидазы (такие как глюкозоксидаза, галактозоксидаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), гетероцидоксидазы (такие как уриказы и ксантинооксидаза), лактопероксидаза, микропероксидаза и т.п. Способы конъюгирования ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73:147-166.

Примеры комбинаций фермент-субстрат включают, например, пероксидазу хрена (HRPO) с пероксидазой водорода в качестве субстрата, где пероксидаза водорода окисляет предшественник красителя, такой как ортофенилендиамин (OPD) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМБ); щелочная фосфатаза (AP) с паранитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата и β -D-галактозидаза (β -D-Gal) с хромогенным субстратом, таким как п-нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

Многие другие комбинации фермент-субстрат доступны для специалистов в данной области. Для их общего обзора см. патенты США № 4,275,149 и 4,318,980.

В другом варианте осуществления гуманизованное антитело против CD40 используют немеченым и детектируют с помощью меченого антитела, которое связывает гуманизованное антитело против CD40.

Описанные в настоящем документе антитела можно использовать в любом известном методе анализа, таком как анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации. См., например, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, p. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Диагностические наборы.

Гуманизованное антитело против CD40 можно использовать в диагностическом наборе, т.е. в упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по проведению диагностического анализа. Если антитело помечено ферментом, то набор может включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента, такие как предшественник субстрата, который обеспечивает обнаруживаемый хромофор или флуорофор. Кроме того, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т.п. Относительные количества различных реагентов можно широко варьировать для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно оптимизируют чувствительность анализа. Реагенты могут быть представлены в виде сухих порошков, обычно лиофилизированных, включая наполнители, которые при растворении будут давать раствор реагента соответствующей концентрации.

Терапевтическое применение.

В другом варианте осуществления описанное в настоящем документе гуманизованное антитело против CD40 пригодно в лечении различных расстройств, связанных с экспрессией CD40, как описано в настоящем документе.

Гуманизированное антитело против CD40 или средство вводят любым подходящим способом, включая парентеральный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, интратанальный и интраназальный и, если желательно для местного иммуносупрессивного лечения, внутриочаговое введение (включая перфузию или иной контакт трансплантата с антителом до трансплантации). Гуманизированное антитело против CD40 или средство можно вводить, например, в виде инфузии или боллуса. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутривенное или подкожное введение. Кроме того, гуманизированное антитело против CD40 подходящим образом вводят путем пульсовой инфузии, особенно с уменьшающимися дозами антитела. В одном аспекте дозу вводят путем инъекций, наиболее предпочтительно внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела будет зависеть от множества факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжесть и течение заболевания, вводят ли антитело для профилактики или в терапевтических целях, предыдущая терапия, история болезни пациента и реакция на антитело, а также по усмотрению лечащего врача. Антитело обычно вводят пациенту за один раз или в течение серии курсов лечения.

В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно от 1 мкг/кг до 20 мг/кг (например, 0,1-15 мг/кг) антитела является начальной потенциальной дозой для введения пациенту, независимо от того, например, ее вводят за одно или несколько отдельных введений, или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть применимы и другие схемы дозирования. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и тестов. Примерная схема дозирования описана в WO 94/04188.

Термин "подавление" используется здесь в том же контексте, что и "улучшение" и "облегчение" для обозначения уменьшения одной или нескольких характеристик заболевания.

Композиция антител будет составлена, дозирована и введена в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим врачам. "Терапевтически эффективное количество" вводимого антитела будет определено такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения, нарушения, связанного с экспрессией CD40.

Антитело, необязательно, но по выбору, может быть составлено с одним или несколькими средствами, которые в настоящее время используют для профилактики или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества гуманизированного антитела против CD40, присутствующего в составе, типа заболевания или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно используют в тех же дозах и посредством тех же путей введения, которые были предложены выше или примерно от 1 до 99% используемых до настоящего времени дозировок.

Связанные с CD40 нарушения.

Антитела против CD40 или средства пригодны для лечения или профилактики злокачественного новообразования, экспрессирующего CD40, или иммунологического расстройства, характеризующегося экспрессией CD40, например, путем несоответствующей активации иммунных клеток (например, лимфоцитов или дендритных клеток). Такая экспрессия CD40 может быть обусловлена, например, повышенными уровнями белка CD40 на поверхности клеток и/или измененной антигенностью экспрессированного CD40. Лечение или профилактика иммунологического расстройства в соответствии с описанными в настоящем документе способами достигаются путем введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении или профилактике, эффективного количества антитела против CD40 или средства, посредством чего антитело (i) связывается с активированными иммунными клетками, которые экспрессируют CD40 и которые связаны с болезненным состоянием; и (ii) оказывают цитотоксическое, цитостатическое или иммуносупрессивное действие на активированные иммунные клетки.

Иммунологические заболевания, которые характеризуются несоответствующей активацией иммунных клеток и которые можно лечить или предотвращать описанными в настоящем документе способами можно классифицировать, например, по типу(ам) реакции(ий) гиперчувствительности, которые лежат в основе заболевания. Эти реакции обычно подразделяют на четыре типа: анафилактические реакции, цитотоксические (цитолитические) реакции, реакции иммунных комплексов или реакции клеточного иммунитета (СМ) (также называемые реакциями гиперчувствительности замедленного типа (DTH)). (См., например, *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3-е изд. 1993).)

Конкретные примеры таких иммунологических заболеваний включают следующие: ревматоидный артрит, системная красная волчанка, волчаночный нефрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), эндокринная офтальмопатия,

увеоретинит, системная красная волчанка, тяжёлая миастения, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое заболевание, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона или язвенный колит), анафилаксия, аллергическая реакция, синдром Шегрена, сахарный диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгия, полимиозит, дерматомиозит, воспалительный миозит, множественная эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреодит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, злокачественная анемия, атрофия желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострая кожная красная волчанка, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, вульгарная пузырчатка, пузырчатка, герпетический дерматит, аркатная алопеция, пемфигоид, склеродермия, прогрессирующий системный склероз, синдром CREST (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартериит, системный некротизирующий васкулитоперистит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическая лихорадка, астма, самопроизвольный аборт, антифосфолипидный синдром, легкое фермера, мультиформная эритема, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, лёгочная аллергия птицезодов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, узловая эритема, гангренозная пиодермия, трансфузионная реакция, артериит Такаюсу, ревматическая полимиалгия, височный артериит, шистосомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллёз, синдром Самптера, экзема, лимфоматоидный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойкая возвышающаяся эритема, псориаз, эритробластоз плода, эозинофильный фацит, синдром Шутьмана, синдром Фелти, филяриатоз, циклит, хронический циклит, гетерохронный циклит, циклит Фукса, нефропатия IgA, пурпура Шенлейна-Геноха, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатия, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемия, макроглобулемия Вальденстрема, синдром Эвана, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, остеопороз, гиперчувствительность замедленного и аутоиммунная гонадная недостаточность.

Соответственно, способы, описанные в настоящем документе, охватывают лечение нарушений, связанных с В-лимфоцитами (например, системной красной волчанки, синдрома Гудпасчера, ревматоидного артрита и диабета I типа), Th1-лимфоцитами (например, ревматоидного артрита, множественного склероза, псориаза, синдром Шегрена, тиреоидита Хашимото, болезни Грейвса, первичного билиарного цирроза, гранулематоза Вегенера, туберкулеза или болезни "трансплантат против хозяина") или Th2-лимфоцитами (например, атопического дерматита, системной красной волчанки, атопической астмы, риноконъюнктивита, аллергического ринита, синдром Оменна, системного склероза или хронической болезни "трансплантат против хозяина"). Как правило, нарушения, связанные с дендритными клетками, включают нарушения Th1-лимфоцитов или Th2-лимфоцитов.

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой одно из наиболее распространенных воспалительных аутоиммунных заболеваний, которым страдает примерно 1% населения. Несмотря на то, что доступны эффективные способы лечения (например, МТХ и средства против ФНО), в медицине существует большая неудовлетворенная потребность, особенно для тех пациентов, которые не реагируют должным образом на терапию против ФНО (около 30% пациентов). Кроме того, до 50% пациентов прекращают лечение антагонистами ФНО в течение 5 лет в основном из-за побочных эффектов, а также из-за того, что все большее число пациентов теряет терапевтический эффект. Таким образом, важно разработать эффективные способы лечения, направленные на борьбу с воспалением и разрушением суставов при РА, но не полагаться только на прямое ингибирование ФНО. Весьма привлекательный подход состоит в том, чтобы направить воздействие на костимуляторные клеточные пути. Одной из ключевых пар рецептор-лиганд при костимуляции является CD40/CD40L. Эта система позволяет взаимодействовать между иммунными клетками, а также между иммунными и неиммунными клетками, все из которых важны в патогенезе РА. Блокада CD40 антагонистическим антителом в соответствии с настоящим изобретением может иметь один или несколько из следующих эффектов при РА:

- 1) ингибировать дифференцировку В-клеток и переключение изотипа антител;
- 2) ингибировать выработку цитокинов и хемокинов и повышенную регуляцию молекул адгезии в Т-клетках и макрофагах;
- 3) ингибировать активацию дендритных клеток и
- 4) ингибировать выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, простагландинов и понижать регуляцию молекул адгезии в неиммунных клетках (например, эпителиальных, эндотелиальных и мезенхимальных клетках).

В настоящем документе прямо предусмотрены способы достижения одного или нескольких из вышеуказанных эффектов. Помимо РА, композиции в соответствии с настоящим изобретением будут особенно пригодны в способах лечения системной красной волчанки, волчаночного нефрита, рассеянного

склероза, псориаза (включая псориатический артрит), ювенильного ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, системной красной волчанки и трансплантации паренхиматозных органов.

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание, которое встречается у взрослых примерно в 1% случаев. Заболевание продолжает вызывать значительную заболеваемость и преждевременную смертность (смертность в основном связана с высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний). В настоящее время установлено, что повреждение суставов происходит на очень ранней стадии заболевания, при этом до 30% пациентов демонстрируют рентгенологические признаки эрозий костей на момент постановки диагноза, а через 1 год их количество увеличивается до 60%. Текущие руководства рекомендуют начинать терапию традиционными противоревматическими препаратами, модифицирующими болезнь (DMARD), в течение 3 месяцев после установления точного диагноза. DMARD могут уменьшить или предотвратить повреждение суставов и сохранить их функцию. В настоящее время ревматологи выбирают метотрексат (MTX) в качестве начальной терапии DMARD для большинства пациентов.

Антагонисты ФНО этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®), антагонист CTLA4 абатацепт (Orencia®), mAb тоцилизумаб против рецептора IL-6 и mAb ритуксимаб против CD20 (Rituxan®) эффективны при лечении РА. Текущие руководства обычно рекомендуют использовать биологические DMARD для лечения активного РА после неадекватного ответа на традиционные DMARD.

Недавние исследования с участием пациентов с ранним агрессивным РА без предшествующего лечения метотрексатом показали, что комбинация метотрексата с антагонистом ФНО превосходила каждый из них при использовании в качестве монотерапии. Самым поразительным результатом было значительное радиологическое преимущество комбинированной терапии. Таким образом, комбинацию ингибиторов MTX и ФНО следует использовать у пациентов с наибольшим риском агрессивного заболевания и агрессивного фенотипа (например, высокая оценка активности, функциональное нарушение, серопозитивность по ревматоидному фактору (RF) или антитело к циклическому цитруллинированному пептиду (CCP), повышенный CRP, рентгенологические эрозии). Однако авторы изобретения ожидают, что в клинической практике антагонисты ФНО будут редко использоваться в качестве терапии первой линии. Опрос американских ревматологов, проведенный в апреле 2005 года, показал, что факторами, которые больше всего влияют на решение использовать антагонист ФНО, были: неэффективность MTX или нескольких DMARD, общая оценка врача, функциональные нарушения и рентгенографическое ухудшение или эрозии. В настоящее время в США примерно 20% пациентов с РА получают терапию ингибиторами ФНО.

Значительному проценту пациентов с РА не оказывают адекватной помощи посредством имеющихся способов лечения, включая биологическую терапию, либо из-за непереносимости и токсичности лекарств, либо из-за отсутствия ответа. До 50% пациентов прекращают лечение антагонистами ФНО в течение 5 лет, в основном из-за побочных эффектов, но также из-за того, что у все большего числа пациентов утрачивается ответная реакция.

В некоторых вариантах осуществления иммунологическое нарушение представляет собой опосредованное Т-клетками иммунологическое нарушение, такое как Т-клеточное заболевание, при котором активированные Т-клетки, связанные с нарушением, экспрессируют CD40. Антитела против CD40 или средства можно вводить для истощения таких экспрессирующих CD40 активированных Т-клеток. В конкретном варианте осуществления введение антител против CD40 или средств может истощить экспрессирующие CD40 активированные Т-клетки, в то время как Т-клетки в состоянии покоя, по существу, не истощаются антителом против CD40 или средством. В этом контексте "по существу не истощаются" означает, что менее примерно 60%, менее примерно 70% или менее примерно 80% Т-клеток в состоянии покоя не истощены.

Антитела против CD40 и средства, описанные в настоящем документе, также пригодны для лечения или предотвращения рака, экспрессирующего CD40. Лечение или профилактика рака, экспрессирующего CD40, в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, достигается путем введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении или профилактике, эффективного количества антитела против CD40 или средства, посредством чего антитело или средство (i) связывается с раковыми клетками, экспрессирующими CD40; и (ii) оказывает цитотоксический или цитостатический эффект для истощения или ингибирования пролиферации раковых клеток, экспрессирующих CD40.

Экспрессирующие CD40 раковые образования, которые можно лечить или предотвращать описанными в настоящем документе способами, включают, например, лейкоз, такой как острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный или эритролейкоз), хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз или хронический лимфоцитарный лейкоз; истинная полицитемия; лимфома (например, болезнь Ходжкина или неходжкинская болезнь); множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; болезнь тяжёлых цепей; солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосар-

кома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желёз, карцинома сальной железы, папиллярная карцинома, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечно-клеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, немелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки или карцинома пищевода).

Фармацевтические композиции и их введение.

Композиция, содержащая связывающее CD40 средство (например, антитело против CD40), может быть введена субъекту, имеющему с риском развития иммунологического нарушения или рака, экспрессирующего CD40. Кроме того, изобретение предусматривает использование связывающего CD40 средства (например, антитела против CD40) в изготовлении лекарственного средства для профилактики или лечения рака, экспрессирующего CD40, или иммунологического нарушения. Используемый в настоящем документе термин "субъект" означает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить связывающее CD40 средство, включая, например, людей и нечеловеческих млекопитающих, таких как приматы, грызуны и собаки. Особенно предпочтительными субъектам, для которых предназначено лечение с использованием описанных в настоящем документе способов являются люди. Антитела или средства можно вводить отдельно или в комбинации с другими композициями для профилактики или лечения иммунологического нарушения или рака, экспрессирующего CD40.

Предпочтительными антителами для использования в таких фармацевтических композициях являются те, которые содержат гуманизированное антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40.

Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 36. Особенно предпочтительные композиции гуманизированных антител содержат антитело или фрагмент антитела, имеющий варибельный домен тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 26 соответственно; SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 31 соответственно; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 36 соответственно; SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 36 соответственно.

В рамках настоящего изобретения рассматриваются изолированные полинуклеотиды, которые кодируют любую из последовательностей тяжелой цепи SEQ ID NO: 1-4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

Другие варианты осуществления относятся к выделенным нуклеиновым кислотам, которые кодируют последовательность легкой цепи любой из последовательностей SEQ ID NO: 5 -SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 или SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления, где предполагают лечение РА, композиции в соответствии с изобретением можно использовать в способах уменьшения признаков и симптомов, индукции основного клинического ответа и снижения прогрессирования структурных повреждений у пациентов с РА средней или тяжелой формы, которые не реагируют адекватно только на МТХ. В настоящее время примером такой терапии является: энбрел/хумира (данные хумирой и энбрелом были получены в двух разных популяциях пациентов). Композиции в соответствии с настоящим изобретением можно использовать вместо терапии посредством энбрел/хумира или в комбинации с терапией посредством энбрел/хумира для субъектов, которые не отвечают на лечение только с помощью МТХ. Предпочтительно, в таких вариан-

тах осуществления, композиции в соответствии с изобретением будут иметь более высокую эффективность, чем энбрел + MTX у пациентов, у которых была неадекватная ответная реакция на метотрексат, как определено, например, по ACR20 через 6 месяцев >85% для соединения плюс MTX (GS: энбрел + MTX 71% по сравнению с плацебо + MTX 27%, хумира + MTX через 12 месяцев 59% по сравнению с плацебо + MTX 24%)*. Дополнительные критерии превосходной эффективности композиций в соответствии с изобретением могут включать в себя: ингибирование прогрессирования структурных повреждений в течение периода в один год аналогично энбрелу (через 52 недели средняя модифицированная оценка по Sharp хумира+MTX 0,1 по сравнению с плацебо + MTX 2,7)*. В еще других вариантах осуществления композиции вызывают "хороший клинический ответ", превосходящий энбрел, у пациентов, у которых была неадекватная ответная реакция на метотрексат, измеренный с помощью ACR70 (20% для хумира + MTX, 4% для плацебо + MTX)*.

В других вариантах осуществления композиции в соответствии с изобретением показаны для уменьшения признаков и симптомов, вызывая хороший клинический ответ и снижая прогрессирование структурных повреждений у пациентов с умеренно или сильно активным РА, у которых была неадекватная ответная реакция на средства против ФНО. Золотой стандарт в настоящее время: биологическая терапия средствами не против ФНО. Предпочтительно для таких субъектов композиции в соответствии с изобретением обладают не уступающей эффективностью по сравнению с биологическими средствами не против ФНО (например, Oгencia, Rituxan), при хронологическом сравнении у пациентов, у которых была неадекватная ответная реакция на средство против ФНО: ACR20 через 6 месяцев >50% для соединения плюс DMARD (GS: Oгencia + DMARD 50% по сравнению с плацебо + DMARD 20%). В еще других вариантах осуществления композиции в соответствии с изобретением ингибируют прогрессирование структурных повреждений в течение периода в один год, оцененных с помощью общепринятых методов оценки посредством рентгеновских лучей для эрозии суставов и сужения суставной щели, аналогично ритуксану (через 52 недели среднее значение модифицированной оценки по шкале Sharp ритуксан + MTX 1.0 по сравнению с плацебо + MTX 2.31).

Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения связывающего CD40 средства. Способы введения включают, но не ограничиваясь этим, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Связывающее CD40 средство можно вводить, например, посредством инфузии, болюса или инъекции, и его можно вводить вместе с другими биологически активными средствами, такими как химиотерапевтические средства. Введение может быть системным или местным. В предпочтительных вариантах осуществления введение осуществляют путем подкожной инъекции. Составы для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в предварительно заполненных шприцах, которые можно вводить один раз в две недели.

Характеристики безопасности антител в соответствии с изобретением будут определены и предпочтительно включать одну или несколько характеристик, таких как отсутствие клинически значимых неблагоприятных взаимодействий с другими лекарственными средствами, обычно используемыми для лечения ревматоидного артрита (например, DMARD, стероиды, НПВП); отсутствие большого количества случаев прекращения приема препарата из-за проблем с безопасностью или переносимостью по сравнению с энбрелом; частота серьезных инфекций не выше, чем у средств против ФНО или других широко используемых биологических средств; частота и/или тяжесть реакций в месте инъекции или инфузионных реакций, подобных энбрелу; отсутствие или минимальное развитие устойчивости к лекарственному средству (менее 5%) при повторных курсах терапии; отсутствие или минимальное количество нейтрализующих антител; отсутствие доказательств усиленной агрегации/активации тромбоцитов, которая могла бы привести к тромбозам или тромбозам *in vivo* или дисфункции тромбоцитов/эндотелия, которая могла бы привести к кровотечению.

В отдельных вариантах осуществления композицию связывающего CD40 средства вводят путем инъекции с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем имплантат представляет собой пористый, непористый или гелеобразный материал, включая мембрану, такую как сиаластика мембрана или волокно. Обычно при введении композиции используют материалы, которые не абсорбируются антителом против CD40 или средством.

В других вариантах осуществления антитело против CD40 или средство доставляются системой контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления может быть использован насос (см., например, Langer, 1990, *Science*, 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery*, 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). В другом варианте осуществления могут быть применены полимерные материалы, (см., например, *Medical Applications of Controlled Release* (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger и Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. См. также Levy et al., 1985, *Science*, 228:190; Doring et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Обсуждаются другие системы с контролируемым высвобождением, например, у Langer, см. выше.

Связывающее CD40 средство (например, антитело против CD40) можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество связывающего средства и

один или несколько фармацевтически совместимых ингредиентов.

В типичных вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного или подкожного введения человеку. Обычно композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат может также включать солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в смеси вместе в стандартной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного вещества. Если фармацевтический препарат вводят путем инфузии, то его можно распределять с помощью бутылки для инфузии, содержащей стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Если фармацевтический препарат вводят путем инъекции, то может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Кроме того, фармацевтическая композиция может быть представлена в виде фармацевтического набора, включающего в себя (а) контейнер, содержащий средство, связывающее CD40 (например, антитело против CD40) в лиофилизированной форме; и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый разбавитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый разбавитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного антитела или средства против CD40. К такому контейнеру(ам) необязательно может быть присоединено уведомление в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических или биологических продуктов, причем уведомление отражает одобрение органом производства, использования или продажи для введения человеку.

Количество связывающего CD40 средства (например, антитело против CD40), которое эффективно при лечении или профилактике иммунологического расстройства или рака, экспрессирующего CD40, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Точная доза, используемая в составе, также будет зависеть от пути введения и стадии иммунологического расстройства или рака, экспрессирующего CD40, и должна быть определена в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

Например, токсичность и терапевтическая эффективность антитела против CD40 антитело или средства можно определить на культурах клеток или экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур определения ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% населения). Предпочтительным является связывающее CD40 средство (например, антитело против CD40), которое проявляет большой терапевтический индекс. Когда связывающее CD40 средство проявляет токсические побочные эффекты, можно использовать систему доставки, которая нацеливает связывающее CD40 средство на участок пораженной ткани, чтобы минимизировать потенциальное повреждение неэкспрессирующих CD40 клеток и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при разработке диапазона доз для применения у людей. Дозировка связывающего CD40 средства обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого связывающего CD40 средства, используемого в способе, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена из анализов клеточных культур. Дозу можно сформулировать на животных моделях для достижения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает IC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное подавление симптомов), как определено в культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимых доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, ELISA и т.п.

Обычно доза антитела против CD40 или связывающего CD40 средства, вводимая пациенту с иммунологическим расстройством или экспрессирующим CD40 злокачественным новообразованием, обычно составляет от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта. Дозировка, вводимая субъекту, составляет от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 15 мг/кг или от примерно 1 до примерно 10 мг/кг массы тела субъекта.

Примерные дозы включают, но не ограничиваясь этим, от 1 нг/кг до 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза составляет примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 12 мг/кг, примерно 13 мг/кг, примерно 14 мг/кг, примерно 15 мг/кг или примерно 16 мг/кг. Дозу можно вводить,

например, ежедневно, один раз в неделю (еженедельно), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, еженедельно или ежемесячно, каждые два месяца или каждые три месяца.

В отдельных вариантах осуществления доза составляет примерно 0,5 мг/кг/неделю, примерно 1 мг/кг/неделю, примерно 2 мг/кг/неделю, примерно 3 мг/кг/неделю, примерно 4 мг/кг/неделю, примерно 5 мг/кг/неделю, примерно 6 мг/кг/неделю, примерно 7 мг/кг/неделю, примерно 8 мг/кг/неделю, примерно 9 мг/кг/неделю, примерно 10 мг/кг/неделю, примерно 11 мг/кг/неделю, примерно 12 мг/кг/неделю, примерно 13 мг/кг/неделю, примерно 14 мг/кг/неделю, примерно 15 мг/кг/неделю или примерно 16 мг/кг/неделю. В некоторых вариантах осуществления доза варьируется от примерно 1 до примерно 15 мг/кг/неделю.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие связывающее CD40 средство, могут дополнительно содержать терапевтическое средство, либо конъюгированное, либо неконъюгированное со связывающим средством. Антитело против CD40 или связывающее CD40 средство можно вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами для лечения или профилактики иммунологических расстройств или экспрессирующих CD40 злокачественных новообразований. Например, комбинированная терапия может включать в себя цитостатическое, цитотоксическое или иммунодепрессивное средство. Комбинированная терапия также может включать, например, введение средства, нацеленного на рецептор или рецепторный комплекс, отличный от CD40, на поверхности активированных лимфоцитов, дендритных клеток или раковых клеток, экспрессирующих CD40. Пример такого средства включает второе, не CD40 антитело, которое связывается с молекулой на поверхности активированного лимфоцита, дендритной клетки или раковой клетки, экспрессирующей CD40. Другой пример включает лиганд, нацеленный на такой рецептор или рецепторный комплекс. Обычно такое антитело или лиганд связывается с рецептором клеточной поверхности на активированных лимфоцитах, дендритных клетках или раковых клетках, экспрессирующих CD40, и усиливает цитотоксический или цитостатический эффект антитела против CD40 путем доставки цитостатического или цитотоксического сигнала к активированным лимфоцитам, дендритным клеткам или злокачественным клеткам, экспрессирующим CD40.

Такое введение комбинированной терапии может иметь аддитивный или синергетический эффект на параметры заболевания (например, тяжесть симптома, количество симптомов или частоту рецидивов).

Что касается терапевтических схем комбинаторного введения, в конкретном варианте осуществления антитело против CD40 или связывающее CD40 средство вводят одновременно с терапевтическим средством. В других конкретных вариантах осуществления терапевтическое средство вводят до или после введения антитела против CD40 или связывающего CD40 средства, по меньшей мере в течение от 1 ч и до нескольких месяцев, например по меньшей мере в течение 1, 5, 12 ч, одного дня, недели, месяца или трех месяцев, до или после введения антитела против CD40 или связывающего CD40 средства.

Применимые классы цитотоксических или иммуносупрессивных средств включают в себя, например, антитубулиновые средства, ауристатины (например, MMAE или MMAF), средства, связывающие малые бороздки ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие средства (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис-(платина) и трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиотерапевтические сенситизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, преобразующие соединения, пуриновые антиметаболиты, пурамицины, сенситизаторы излучения, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и т.п.

Отдельные цитотоксические или иммунодепрессивные средства включают, например, андроген, антрамицин (АМС), аспарагиназу, 5-азациитидин, азатиоприн, блеомицин, бусульфид, бутионинсульфоксимин, камптотедин, карбоплатин, кармустин (BSNU), CC-1065, хлорамбуцил, цисплатин, колхицин, циклофосфамид, цитарабин, цитидин арабинозид, цитохалазин В, дакарбазин, дактиномицин (ранее актиномицин), даунорубин, декарбазин, доцетаксел, доксорубин, эстроген, 5-фтордезоксифуридин, 5-фторурацил, грамицидин D, гидроксимочевина, идарубин, ифосфамид, иринотекан, ломустин (CCNU), мехлорэтамин, мелфалан, 6-меркаптопурин, метотрексат, митрамицин, митомицин С, митоксантрон, нитроимидазол, паклитаксел, пликамицин, прокарбазин, стрептозотозин, тенопозид, 6-тиогуанин, тиотепа, топотекан, винбластин, винкристин, винорелбин, VP-16 и VM-26.

В некоторых типичных вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой цитотоксическое средство. Пригодные цитотоксические средства охватывают, например, доластатины (например, ауристатин Е, АФР, MMAF, MMAE, АЕВ или АЕВВ), вещества, связывающие малые бороздки ДНК (например, энедины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), пурамицины, алкалоиды барвинка, CC-1065, SN-38, топотекан, морфолинодоксорубин, ризоксин, цианоморфолино-доксорубин, эхиномицин, комбретастин, нетропсин, эпотилон А и В, эстрамустин, эстрамустин, цемадотин, майтанзиноиды, дискодермолид, элеутеробин или митоксантрон.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический препарат представляет собой обычное химиотерапевтическое средство, такое как, например, доксорубин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митомицин С или этопозид. Кроме того, сильнодействующие средства, такие как

аналоги СС-1065, калихеамицин, майтанзин, аналоги доластатина 10, ризоксин и палитоксин, могут быть связаны с антителами против CD40 или их средствами.

В отдельных вариантах осуществления цитотоксическое или цитостатическое средство представляет собой ауристатин Е (также известный в данной области как доластатин-10) или его производное. Обычно производное ауристатиона Е представляет собой, например, сложный эфир, образованный между ауристатином Е и кетокислотой. Например, ауристатин Е может реагировать с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с образованием АЕВ и АЕВВ соответственно. Другие типичные производные ауристатиона включают АРР, ММАФ и ММАЕ. Синтез и структура ауристатиона Е и его производных описаны, например, в публикациях патентных заявок США № 2004-0157782 А1 и 2005-0238649; международной патентной заявке № РСТ/US03/24209, международной патентной заявке № РСТ/US02/13435 и патентах США № 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444 и 4,486,414, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

В отдельных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой средство, связывающее малые бороздки ДНК (см., например, патент США № 6,130,237.) Например, в некоторых вариантах осуществления средство, связывающее малые бороздки, представляет собой соединение СВ1. В других вариантах осуществления средство, связывающее малые бороздки, представляет собой ендиин (например, калихеамицин).

Примеры анти tubулиновых средств включают, но не ограничиваются ими, таксаны (например, Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел)), Т67 (Tularik), алкилоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и доластатин (например, ауристатин Е, АРР, ММАФ, ММАЕ, АЕВ, АЕВВ). Другие анти tubулиновые средства включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотион А и В), нокодазол, колхицин и колчимид, эстрамустин, криптофицины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, другая группа анти tubулиновых средств. Например, в отдельных вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой майтанзин или DM-1 (ImmunoGen, Inc.; см. также Charl et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство не является радиоизотопом.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое или иммунодепрессивное средство представляет собой антиметаболит. Антиметаболит может представлять собой, например, антагонист пуринов (например, азотиоприн или микофенолата мофетил), ингибитор дигидрофолатредуктазы (например, метотрексат), ацикловир, ганцикловир, зидовудин, видарабин, рибавирин, азидотимидин, цитидин арабинозид, амантадин, дидезоксиуридин, йододезоксиуридин, поскамет или трифлуридин.

В других вариантах осуществления цитотоксическое или иммунодепрессивное средство представляет собой такролимус, циклоспорин или рапамицин. В дополнительных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой альдеслейкин, алемтузумаб, алитретиноин, аллопуринол, альтретагин, амифостин, анастрозол, триоксид мышьяка, бексаротен, бексаротен, калустерон, капецитабин, целекоксиб, кладрибин, дарбэпозтин альфа, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, дромостанолон пропионат, эпирубицин, эпоэтин альфа, эстрамустин, экземестан, филграстин, флоксуридин, флударабин, фулвестрант, гемцитабин, гемтузумаб озогамин, госерелин, идарубицин, ифосфамид, иматиниб мезилат, интерферон альфа-2а, иринотекан, летрозол, лейковорин, левамизол, меклорэтамин или азотистый иприт, мегестрол, месна, метотрексат, метоксален, митомицин С, митотан, нандролон фенопропионат, опрелвекин, оксалиплатин, памидронат, пегадемаза, пегаспаргаза, пегфилграстин, пентостатин, пипоброман, пликамицин, порфирин натрия, прокарабазин, хинакрин, расбуриказа, ревлимид, сарграмостим, стрептозоцин, тамоксифен, темозоломид, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, торемифен, тозитумомаб, трастузумаб, третиноин, урациловый иприт, валрубицин, винбластин, винкристин, винорелбин и золедронат.

В дополнительных вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой гуманизованное моноклональное антитело против HER2; RITUXAN (ритуксимаб; Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния); химерное моноклональное антитело против CD20; OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; мышинное антитело IgG_{2a}); цетуксимаб эрбитукс (Imclone Systems Inc., NY; химерное антитело против EGFR IgG); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (лейкоцит, MA; гуманизованное антитело IgG₁); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; гуманизованное антитело против CD33 IgG); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; гуманизованное антитело против CD22 IgG); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; гуманизованное антитело против HLA-DR); Онколим (Techniclone, Inc., CA; мышинное антитело против HLA-Dr10, меченное радиоактивной меткой); Алломун (BioTransplant, CA; гуманизованное mAb против CD2); Авастин (Genentech, Inc., CA; гуманизованное антитело против VEGF); Эпратузамаб (Immunomedics, Inc., NJ и Amgen, CA; антитело против CD22) и CEAcide (Immunomedics, NJ; гуманизованное антитело против CEА).

Другие пригодные антитела включают, но не ограничиваются ими, антитела против следующих ан-

тигенов: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y., Lewis X., альфа-фетопротеин, СА 242, плацентарная щелочная фосфатаза, простатоспецифический антиген, простатическая кислая фосфатаза, эпидермальный фактор роста, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, рецептор против трансферрина, р97, MUC1-KLH, СЕА, gr100, MARTI, специфический антиген простаты, рецептор IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, хорионический гонадотропин человека, CD38, муцин, P21, MPG и продукт онкогена Neu.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой иммунодепрессивное средство. Иммунодепрессивное средство может представлять собой, например, ганцикловир, этанерцепт, такролимус, циклоспорин, рапамицин, циклофосамид, азатиоприн, микофенолата мофетил или метотрексат. Альтернативно, иммунодепрессивное средство может представлять собой, например, глюкокортикоид (например, кортизол или альдостерон) или аналог глюкокортикоида (например, преднизон или дексаметазон).

Пригодные ингибиторы циклооксигеназы включают меклофенамовую кислоту, меклофенаминую кислоту, карпрофен, диклофенак, дифлунизал, фенбуфен, фенопрофен, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, набуметон, напроксен, сулиндак, теноксикам, толметин и ацетилсалициловую кислоту.

Пригодные ингибиторы липоксигеназы включают ингибиторы окислительно-восстановительного потенциала (например, производные катехолбутана, нордигидрогваяретовую кислоту (NDGA), мазопрокол, фенидон, ианопален, индазолиноны, нафазатром, бензофуранол, алкилгидроксиламин) и не окислительно-восстановительные ингибиторы (например, гидрокситиазолы, метоксиалкилтиазолы, бензопираны и их производные, метокситетрагидропиран, босвеллиевые кислоты и ацелированные производные босвелловых кислот и хинолинметоксифенилукусные кислоты, замещенные циклоалкильными радикалами, и предшественники окислительно-восстановительных ингибиторов).

Другие пригодные ингибиторы липоксигеназы включают антиоксиданты (например, фенолы, пропилгаллат, флавоноиды и/или встречающиеся в природе субстраты, содержащие флавоноиды, гидрокселированные производные флавонов, флавонол, дигидрокверцетин, лютеолин, галангин, оробол, производные халкона, 4,2',4'-тригидроксиалкон, ортоаминофенолы, N-гидроксимочевины, бензофуранолы, эбселен и соединения, которые увеличивают активность восстанавливающих селеноферментов), хелатирующие агенты с железом (например, гидроксамовые кислоты и их производные, N-гидроксимочевины, 2-бензил-1-нафтол, катехолы, гидроксилмины, карнозол тролокс С, катехол, нафтол, сульфасалазин, зилейтон, 5-гидроксиантраниловая кислота и 4-(омега-арилалкил)фенилалкановые кислоты), имидазолсодержащие соединения (например, кетоконазол и итраконазол), фенотиазины и производные бензопирана.

Еще другие подходящие ингибиторы липоксигеназы включают ингибиторы эйкозаноидов (например, октадекатетраеновая, эйкозатетраеновая, докозапентаеновая, эйкозагексаеновая и докозагексаеновая кислоты и их сложные эфиры, PGE1 (простагландин E1), PGA2 (простагландин A2), випростол, 15-моногидроксиэйкозатетраеновая, 15-моногидроксиэйкозатриеновая и 15-моногидроксиэйкозапентаеновая кислоты и лейкотриены B5, C5 и D5), соединения, мешающие потокам кальция, фенотиазины, дифенилбутиламины, верапамил, фускозид, куркумин, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, 5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота (ETYA), гидроксифенилретинамид, лонапален, эскулин, диэтилкарбамазин, фенантролин, байкалеин, проксикромил, тиоэфиры, диаллилсульфид и ди-(1-пропенил)-сульфид.

Антагонисты лейкотриеновых рецепторов включают кальцитриол, онтазоласт,

Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, эбселен, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingleheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK и F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 и Teijin TEI-1338.

Изделия промышленного производства

В другом аспекте предлагается изделие промышленного производства, содержащее материалы, пригодные для лечения описанных выше расстройств. Изделие промышленного производства включает в себя емкость и этикетку. Подходящими емкостями являются, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Емкости могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик.

Емкость содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния и может иметь стерильное отверстие для доступа. Например, емкость может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, пробиваемую иглой для подкожных инъекций. Активное средство в композиции представляет собой гуманизованное антитело против CD40. Этикетка на емкости или связанная с емкостью указывает, что композицию используют для лечения выбранного состояния. Изделие может дополнительно содержать вторую емкость, содержащую фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

Изобретение дополнительно описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Производство гуманизованного антитела против CD40.

Мышиные антитела 20E2 и 2H11 представлены в табл. 1 и 2 в настоящем документе выше. Гуманизация клонов 20E2 и 2H11 была завершена. Была создана библиотека, в которой остатки человека и мыши были изменены таким образом, что в любом заданном положении мог быть остаток человека или мыши. Такая библиотека была создана для тех аминокислот, которые различались между зародышевой линией человека и мышинным антителом. Были отобраны только клоны, которые сохраняют функцию родительского мышинового антитела.

Таким образом, Антитело А, антитело В и антитело С представляли собой гуманизованные антитела, полученные из мышинового антитела 20E2 (антитело А и антитело В) или 2H11 (антитело С), клонированного в человеческий IgG₁-КО (КО = нокаут)/каппа оств. IgG₁-КО имеет две мутации в области Fc, Leu234Ala и Lue235Ala, чтобы уменьшить связывание FcγR и комплемента.

В результате такой гуманизации были получены различные гуманизованные переменные последовательности тяжелых и легких цепей, приведенные ниже:

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

DIVMTQSPDLSAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

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

EVQLVKSQGGGLVKPGLSRLSCLASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLVTVSS

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

DIVMTQSPDLSAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

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

EVQLVESGGGLVKPGLSRLSCLASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLVTVSS

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

DIVMTQSPDLSAVSLGKVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

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

EVQLVESGGGLVKPGLSRRSCLASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLVTVSS.

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

DIVMTQSPDLSAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 48 (последовательность переменной области тяжелой цепи):

EVQLVESGGGLVKPGLSRLSCLASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 49 (последовательность переменной области легкой цепи):

DIVMTQSPDLSAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

SEQ ID NO: 50 (последовательность переменной области легкой цепи):

EVQLVESGGGLVKPGLSRRSCLASGFTFSQYGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 51 (последовательность переменной области легкой цепи):

DIVMTQSPDLSAVSLGKVTMNCSSQSLNLSGNQKNYLTWHQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK.

- SEQ ID NO: 52 (последовательность вариабельной области легкой цепи):
 DIVMTQSPDLSLAVSLGKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWHQQKPGQPPLLIYWTSTRESGVPDRFSG
 SSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYCQNDYTYPLTFGGGKVEIK
- SEQ ID NO: 53 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQAPGGQLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTI
 SRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 54 (последовательность вариабельной области легкой цепи):
 QIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQQKPKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDF
 TLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPTFGGGKVEIK
- SEQ ID NO: 55 (последовательность вариабельной области легкой цепи):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQQKPKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDF
 TLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPTFGGGKVEIK
- SEQ ID NO: 56 (последовательность вариабельной области легкой цепи):
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQQKPKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTISLQPEDFATYYCQQRTFYPTFGGGKVEIK
- SEQ ID NO: 57 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWVGRI DPEDGDSKYAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS.
- SEQ ID NO: 58 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIDYVHWVKQAPGGQLEWVGRI DPEDGDSKYAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 59 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWVGRI DPEDGDSKYAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS.
- SEQ ID NO: 60 (установленная последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIDYVHWVKQAPGGQLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 61 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQAPGGQLEWVGRI DPEDGDSKYAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 62 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWVGRI DPEDGDTKFAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 63 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQRPQGQLEWVGRI DPEDGDTKFAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 64 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIDYVHWVKQAPGGQLEWIGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 65 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIDYVHWVKQAPGGQLEWVGRI DPEDGDTKFAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 66 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNITDYYVHWVKQAPGGQLEWVGRI DPEDGDTKFAPKFQGKATM
 TADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 67 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIDYVHWVKQRPKGQLEWVGRI DPEDGDTKYDPKFQGRVTM
 TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 68 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYVHWVKQRPKGQLEWVGRI DPEDGDTKYDPKFQGRVTM
 TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 69 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):
 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIDYVHWVKQRPKGQLEWVGRI DPEDGDTKYDPKFQGRVTM
 TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 70 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQ GKATM
TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 71 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQ GKATM
TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 72 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYIHWVKQAPGKLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQ GKATM
TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 73 (последовательность вариабельной области тяжелой цепи):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYIHWVQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTM
TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTGYGWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 74 (последовательность вариабельной области легкой цепи) 1 из антитела 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSYILWFQPKPKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 75 (последовательность вариабельной области легкой цепи) 2 из антитела 10F2Hum:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSYILWFQPKPKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 76 (последовательность вариабельной области легкой цепи):

QIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSYILWFQPKPKAPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQRTFYPYTFGGGTKVEIK

Примерные гуманизированные антитела в соответствии с настоящим изобретением представляют собой антитела, которые имеют последовательности тяжелой и легкой цепи, указанные в следующей таблице. Последовательности, выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые в следующей таблице, представляют собой вариабельные домены, тогда как нормальные, не подчеркнутые последовательности являются константными доменами.:

Идентичность	Последовательность	SEQ ID NO:
Антитело А (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTW</u> <u>HQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTIS</u> <u>SLQAEDEVAVVYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR</u> TVAAPSVEFI FPPSDEQLKSGTASVCLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1K0)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSEGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
Антитело А (тяжелая цепь, IgG1)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSEGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
Антитело А (тяжелая цепь, IgG4DM)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAYISSEGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN	29

	HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEFEGGSPVFLFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDFEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
Антитело А (тяжелая цепь , IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGNRI IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
Антитело В (легкая цепь)	<u>DIVMTQSPDLSAVSLGEEKVTINCKSSQSLNLSGNQKNYL</u> <u>TWHQQKPGQPKLLIYWTSTRESGVPRDFSGSGSDTDF</u> <u>LTISLQAEADVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKEIKRTVA</u> APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
Антитело В (тяжелая цепь , IgG1KOb)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGNRI IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
Антитело В (тяжелая цепь , IgG1)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGNRI IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
Антитело В (тяжелая цепь , IgG4 DM)	<u>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSGNRI IYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYICARQDGYRYAMDYWGQGLTVTVSSASTK</u> GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEFEGGSPVFLFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDFEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34

	VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK	
Антитело В (тяжелая цепь, IgG1K0b)	<u>EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTTSDYGMHWVRQAP</u> <u>GKGLEWVAIYSSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYIQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS</u> ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	35
Антитело С (легкая цепь)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMLWFQ</u> <u>QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSDFTL</u> <u>TISLQPEDFATYYCQQRFTFYPTFGGGTKVEIKRT</u> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1K0)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVHWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGTLLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	37
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVHWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGTLLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	38
Антитело С (тяжелая цепь, IgG4 DM)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVHWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGTLLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYICNVN KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK	39
Антитело С (тяжелая цепь, IgG1K0b)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCSTASGFNIKDYVHVHWKQAP</u> <u>GGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME</u> <u>LSSLRSED TAVYYCTTSYYVGTGYWGQGTLLVTVSS</u> ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	40

Вариабельные области были субклонированы в один или два различных пригодных вектора экспрессии IgG:

А) формат человеческого IgG₁-KO (нокаут)/каппа с двойной мутацией Leu234Ala, Leu235Ala в области Fc для снижения эффекторной функции, такой как связывание FcγR и комплемента;

В) формат человеческого IgG₄-DM (двойной мутант)/каппа с мутацией Ser228Pro в шарнирной области для уменьшения встречаемости полумолекул IgG₄ и мутацией Leu235Glu для дальнейшего снижения связывания FcγR.

Два кандидата антитело А и антитело В очищали и оценивали по следующим критериям:

- внешний вид CCF (помутнение);
- фильтрующие свойства CCF;
- выход rProteinA;
- помутнение при элюировании и нейтрализации;
- растворимые агрегаты (SEC);
- образец чистоты/загрязнения (SDS);

схема зарядов (IEF).

Пример 2. Данные *in vitro*.

Антитело А, антитело В и антитело С были охарактеризованы вместе с антителами 4D11 (Kirin/Astellas) и PG-102 (PanGenetics), которые были получены на основе опубликованных последовательностей. Данные для антитела А, антитела В, антитела С и 4D11 показаны ниже. PG-102 проявлял агонистическую активность, и только неполное ингибирование пролиферации В-клеток (не показано). В табл. 6 обобщены полученные данные. Более подробное описание данных представлено в табл. 6.

Таблица 6

Обобщенные данные *in vitro* антитела А, антитела В и антитела С и антитела Kirin 4D11 против CD40

Параметр/анализ	Антитело А	Антитело В	Антитело С	4D11
Kd +/- чел. сыворотка	<100 пМ	<100 пМ	<100 пМ	<100 пМ
Связывание клеток (EC ₅₀ /нМ ± SD)	1.2 (±0.28)	1.5 (±0.68)	1.7 (±0.28)	0.9 (±0.3)
Пролиферация В-клеток:антагонизм (IC ₅₀ /нМ±SD)	0.3 (±0.13)	0.2 (±0.10)	0.1 (±0.004)	0.03 (±0.02)
Пролиферация В-клеток:агонизм (SI*) (IC ₅₀ /нМ±SD)	Нет агонизма (SI <2)			
Дендритные клетки/IL-12/23p40 Антагонизм (IC ₅₀ /нМ ± SD)	< 1 нМ	< 1 нМ	< 1 нМ	< 1 нМ
Дендритные клетки /IL-12/23p40 Агонизм	Нет агонизма	Нет агонизма	Нет агонизма	Нет агонизма
Виды перекрестной реакт.: Ну/Суно связывание (соотношения EC ₅₀ **)	3	2	1	Не тестировали

* SI: индекс стимуляции;

** соотношение >1 означает повышенное связывание с Суно по сравнению с Human.

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

Специфическое связывание гуманизированных антител с клеточным CD40 анализировали проточной цитометрией с использованием человеческих клеток HEK293, трансфицированных CD40. Наблюдали зависящее от концентрации связывание антитела А, антитела В и антитела С. Антитела показали аналогичный профиль связывания. Значения EC₅₀ антител в соответствии с настоящим изобретением и антитела Kirin 4D11 находятся в одном и том же диапазоне ~1 нМ, что, скорее всего, находится на границе чувствительности анализа из-за высоких уровней CD40 в трансфицированных клетках. Специфическое связывание гуманизированных антител с клеточным CD40 на человеческих клетках Ramos также продемонстрировало зависящее от концентрации связывание. Антитела демонстрировали несколько разные профили связывания и значения EC₅₀ между 0,21-1,22 нМ. Связывание не было обнаружено на CD40-отрицательных клетках, таких как нетрансфицированные клетки HEK293 или линия Т-клеток HSB-2, что подтверждает избирательное связывание с CD40 (данные не показаны).

Аффинность связывания антитела А, антитела В и антитела С с человеческим белком CD40-Fc измеряли с помощью ForteBio Octet и выявляли константы диссоциации (K_D) <100 пМ. Из-за бивалентности антител и CD40-Fc эффекты avidности препятствуют точному определению K_D ниже 100 пМ. Кроме того, связывание с CD40-Fc было проанализировано в отсутствие и в присутствии 50% сыворотки человека, и не наблюдали значительного влияния сыворотки на связывание (данные не показаны).

В. Активность гуманизированных антител в анализах активации/пролиферации В-клеток.

Активность гуманизированных антител тестировали в анализе пролиферации В-клеток, в котором В-клетки человека, полученные из периферической крови, стимулировали рекомбинантным CD40L в присутствии IL-2 и IL-4. Антитело А, антитело В и антитело С показали сильное ингибирование пролиферации В-клеток. Сравнение с кривыми ингибирования и значениями IC₅₀ антител В1 и антитела Kirin 4D11 указывает на то, что антитело 4D11 имеет более высокую эффективность при тестировании на нескольких донорах. При тестировании на агонистическую активность в отсутствие CD40L антитела, такие как антитело В, антитело А и антитело С, не индуцировали какую-либо пролиферацию В-клеток выше фоновых уровней при концентрациях до 10 мкг/мл (67 пМ), аналогично антителу 4D11.

Конкурентное антитело 4D11 оказалось немного более сильнодействующим, со средней IC₅₀ ~0,02 нМ и отсутствием агонистических эффектов. Данные для трех антител против В1 и 4D11 обобщены в табл. 6 выше. Другое конкурентное антитело, PG-102 (полученное из клона 5D12), также испытанное в этом анализе, показало значительные агонистические эффекты, стимулирующие пролиферацию В-клеток в отсутствие CD40L. Следовательно, отсутствие агонистической активности у свинцовых кандидатов в соответствии с изобретением четко отличает их от PG-102.

Во втором анализе антитела оценивали на ингибирование повышенной регуляции CD86 в В-клетках человека. В этом случае анализ можно проводить с цельной кровью человека или с очищенными В-клетками, как в присутствии экзогенного CD40L. В соответствии с данными о пролиферации В-клеток антитело В, антитело А и антитело С, протестированные в цельной крови человека, показали сильное ингибирование CD40-опосредованной повышенной регуляции CD86, как измерено с помощью проточной цитометрии. Антитело С показало эффективность, аналогичную 4D11, в этом анализе, в то время как эффективность антитела В и антитела А была несколько слабее. Сравнение антитела В и 4D11 на очищенных В-клетках или в цельной крови показывает, что эффективность антитела В (значения IC₅₀ и IC₉₀) относительно не изменяется для очищенных В-клеток по сравнению с В-клетками в присутствии других клеток, несущих CD40 или сыворотки, в то время как 4D11 претерпевает резкое изменение активности в условиях цельной крови.

Аналогичные данные были получены, когда антитело В, антитело А и антитело С оценивали на ингибирование повышенной регуляции CD86 на В-клетках яванского макака при использовании образцов цельной крови. Антитело В, антитело А и антитело С, испытанные в цельной крови яванского макака, показали сильное ингибирование CD40-опосредованной повышенной регуляции CD86, как измерено с помощью проточной цитометрии. Таким образом, все эти антитела проявляют функциональную перекрестную реактивность к CD40 яванского макака со сходной эффективностью с CD40 человека.

Активность антитела В IgG₁KOb и антитела В IgG₁WT оценивали на предмет способности опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность. В этом анализе клетки RAMOS инкубировали с человеческими РВМС при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 50:1. Антитело В IgG₁KOb и антитело В IgG₁WT титровали от 20 мкг/мл и степень гибели клеток контролировали по высвобождению ЛДГ. Показанные данные взяты из одного репрезентативного эксперимента. Данные показывают, что антитело А IgG₁Wt 20E2-12-RlgG₁WT является эффективным медиатором ADCC и что Антитело В IgG₁KOb, содержащее мутации, устраняющие эффекторную функцию, не обладают активностью ADCC.

Пример 3. Фармакокинетические/фармакодинамические исследования.

А. Однократное внутривенное введение антитела А и антитела В в дозе 1 или 10 мг/кг у яванских макаков.

Антитело А и антитело В вводили в дозе 1 и 10 мг/кг внутривенно самцам яванских макаков (N=3)/дозу. Образцы крови собирали в период от 0 до 504 ч (3 недели), сыворотку собирали и образцы хранили при -20°C до анализа. Образцы анализировали с помощью сэндвич-ELISA, как описано выше. Профили концентрации в сыворотке крови обоих антител у обезьян после внутривенных доз и фармакокинетические параметры суммированы в табл. 7 (антитело А) и 8 (Антитело В), показанных ниже. Оба антитела продемонстрировали дозозависимую фармакокинетику, позволяя предположить, что при низкой дозе клиренс преимущественно связан с опосредованной мишенью диспозицией, тогда как при более высокой дозе антитело выводится в основном за счет катаболизма. Аналогичные дозозависимые фармакокинетические профили наблюдали для других mAb, нацеленных на мембранно-ассоциированные мишени (например, CD19, CD20, EGFR, CD146 и HER2). Клиренс для антитела А составлял 0,8 и 0,1 мл/ч/кг для доз 1 и 10 мг/кг соответственно. Клиренс для антитела В составлял 0,7 и 0,1 мл/ч/кг для доз 1 и 10 мг/кг соответственно. Равным образом, период полураспада антитела А составлял 1 и 13 дней для доз 1 и 10 мг/кг соответственно, и период полураспада антитела В составлял 2 и 13 дней для тех же соответствующих доз. Хотя антитело В имело немного более длительный период полураспада при более низкой дозе по сравнению с той же дозой для антитела А, нельзя ожидать, что это различие приведет к более длительному воздействию при хроническом введении. AUC для обоих соединений была непропорциональной, а объем распределения (V_{ss}) для обоих соединений приближался к объему плазмы (~40 мл/кг), демонстрируя ограниченное тканевое распределение, обычно наблюдаемое для больших, полярных белковых терапевтических средств. В целом, не было заметных различий в фармакокинетических параметрах между двумя антителами.

Таблица 7

Фармакокинетические параметры антитела А у самцов яванских макаков (N=3)/доза после однократной внутривенной дозы 1 и 10 мг/кг

Доза (мг/кг)	CLp (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	AUC (мкМ.ч)	T _{1/2} (дней)	MRT (дней)
1	0.8 ± 0.03	41 ± 6	8.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
10	0.10 ± 0.02	42 ± 6	660 ± 92	12.6 ± 0.5	17.5 ± 0.3

Таблица 8

Фармакокинетические параметры антитела В у самцов яванских макак (N=3)/доза после однократной внутривенной дозы 1 и 10 мг/кг

Доза (мг/кг)	CLp (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC (мкМ.ч)	T1/2 (дней)	MRT (дней)
1	0.7 ± 0.16	40 ± 2	10.1 ± 2.7	1.5 ± 0.2	2.6 ± 0.8
10	0.09 ± 0.01	41 ± 6	744 ± 55	13.3 ± 3.0	19.3 ± 4.2

В. Фармакодинамическое исследование *ex vivo*.

В рамках описанного выше ФК исследования, описанного выше, авторы изобретения проанализировали фармакодинамические эффекты антител против CD40. Для этого образцы цельной крови инкубировали с рекомбинантным CD40L в течение ночи и определяли увеличение экспрессии CD86 на В-клетках с помощью проточной цитометрии. Образцы анализировали в день 0 (предварительная обработка), день 2, 7 и 14 после введения дозы. Хотя увеличение экспрессии CD86 относительно невелико (~5-20%), наблюдался дозозависимый эффект. В группе животных, которым вводили 10 мг/кг антитела А и антитела В, индукция CD86 была полностью ингибирована через 2, 7 и 14 дней в соответствии с длительным воздействием этой дозы. Животные, которым вводили дозу 1 мг/кг, показали полное ингибирование на 2 день, частичное ингибирование на 7 день и отсутствие ингибирования на 14 день. Потеря фармакодинамического эффекта с течением времени коррелирует с более быстрым клиренсом антитела в группе с низкой дозой.

Пример 4. Исследования, связанные с токсикологией: CD40 на тромбоцитах.

CD40 конститутивно экспрессируется на тромбоцитах человека (Henn, et al., 2001) и (Inwald, et al., 2003), тогда как CD40L быстро и временно экспрессируется на клеточной поверхности активированных тромбоцитов (Henn, et al., 2001). Хотя нельзя ожидать, что антитела против CD40 без связывания FcγR окажут влияние на тромбоциты, важно напрямую продемонстрировать, что это так. Исследования проточной цитометрии были выполнены для демонстрации связывания свинцовых кандидатов против CD40 с тромбоцитами человека и яванского макака.

Ранее с помощью проточной цитометрии было продемонстрировано, что G28.5 и mAb 89 против CD40 mAb связываются с покоящимися тромбоцитами человека (Henn, et al., 2001). Это было подтверждено с использованием антитела G28.5, меченного FITC. Готовили 5-кратные серийные разведения G28.5 и инкубировали в диапазоне от 0,5 мкг/мл до 0,32 нг/мл в 100 мкл тромбоцитов, полученных от людей (2 донора) или яванских макак (3 донора), в течение 30 мин при комнатной температуре. Кроме того, меченные APC mAb против CD45 использовали для идентификации тромбоцитов, связанных с другими типами клеток CD40⁺, с тем, чтобы исключить эти клетки из анализа. После окрашивания антитела тромбоциты промывали и фиксировали посредством Optilyse C и проводили проточную цитометрию. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) определяли как меру связывания антител с тромбоцитами CD45⁺.

Коммерчески доступные 5с3 и выбранные мышинные mAb антитела против CD40 в соответствии с изобретением были помечены FITC. Было подтверждено связывание с клетками Ramos. Количество молекул FITC на молекулу антитела варьировалось от 2 до 4 FITC на молекулу антитела. Готовили пятикратные серийные разведения коммерческих и потенциальных mAb против CD40 в диапазоне от 0,5 мкг/мл до 0,32 нг/мл и инкубировали с тромбоцитами человека (3 донора) и яванского макака (2 донора) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Репрезентативный график, демонстрирующий связывание мышинового кандидатного mAb против CD40 с тромбоцитами человека, был показан ранее в патенте США № 8,591,900. Четыре кандидатных моноклональных антитела проявляли специфическое связывание с тромбоцитами человека по сравнению с меченым FITC изотипическим контрольным антителом. 10F2, 2H11, 19B10 и 20E2 продемонстрировали сопоставимое связывание с тромбоцитами. Аналогичную тенденцию наблюдали для тромбоцитов яванского макака (данные не показаны).

В дополнение к этим исследованиям, непосредственно меченые антитела В и 4D11 сравнивали на способность связывать тромбоциты и В-клетки в образцах цельной крови человека и яванского макака. 4D11 демонстрировал аналогичное связывание (как показано на примере EC₅₀) как с В-клетками, так и с тромбоцитами в образцах крови человека и яванского макака. Антитело В показало аналогичную картину, но с гораздо более слабой связывающей способностью.

Пример 5. Фармакологические исследования *in vivo* в мышинной модели NSG.

Эффективность гуманизированных антител, антитела А, оценивали на модели продуцирования антител, в которой РВМС человека вводили иммунодефицитным мышам NSG для создания реакции "трансплантат против хозяина". Значительную продукцию человеческого IgM (hIgM) и IgG (hIgG) можно обнаружить через 2 недели после приживления. Обработка антителом А в дозах 5 и 1 мг/кг значительно ингибировала ответ hIgG и hIgM на 2 и 3 неделях после приживления. Антитело сравнения (4D11) оценивали при однократной дозе 5 мг/кг, и оно также демонстрировало отмену ответа. Во втором исследовании все антитела - антитело А, антитело В и антитело С были протестированы при однократной дозе

1 мг/кг и показали полное ингибирование ответа IgM и IgG на 2 неделю.

Пример 6. Биомаркерный анализ.

Повышенная регуляция рецепторов: индуцированная CD40L повышенная регуляция рецепторов может быть измерена с помощью проточной цитометрии. Цельную кровь человека можно стимулировать с помощью оптимизированной концентрации растворимого CD40L, и полный процент CD20 + рецептор + клетки можно измерить с помощью проточной цитометрии. Изменение процента экспрессии CD86 на CD20-положительных клетках измеряли параллельно с ФК исследованием на яванских макаках, оценивающим антитела А и В. Данные показывают ингибирование повышенной регуляции CD86 в моменты времени, соответствующие экспозиции антител.

Нацеленная протеомика: повышенная секреция белков при стимуляции CD40 в цельной крови может быть использована в качестве потенциальных биомаркеров. Оптимизированная концентрация растворимого CD40L и время стимуляции были установлены с использованием платформы мультиплексных шариков Lumiplex, обнаруживающей MDC/CCL22 и несколько других секретлируемых белков. Клинические образцы будут оценены из цельной крови человека в полном диапазоне доз mAb против CD40.

Занятость рецепторов: занятость рецепторов CD40 может быть определена в анализе *in vitro* или *ex vivo*, исходя из анализа проточной цитометрии В-клеток цельной крови человека. Текущие кандидаты - антитело в соответствии с настоящим изобретением и неконкурентное антитело 5C3 против CD40 будут использованы для количественного анализа занятости рецептора.

Пример 7. Противоопухолевая активность гуманизованного антитела против CD40.

В некоторых случаях может быть целесообразно определить противоопухолевые свойства антител в соответствии с настоящим изобретением. Такое определение может быть выполнено путем анализа противоопухолевой активности гуманизованного антитела против CD40 на ксенотрансплантатной модели лимфомы мыши SCID. В такую модель SCID можно вводить раковые клетки, чтобы представить опухоль, например 5×10^6 миллионов опухолевых клеток можно вводить подкожно мышам SCID (10/группу) за 13 дней до начала лечения лекарственным средством. Мышиные антитела против CD40 в соответствии с настоящим изобретением или для сравнения (например, контрольное или другое гуманизованное антитело) вводят внутривенно 3 раза в неделю (4 мг/кг/дозу) с 8 или 5 введенными дозами. У мышей отслеживают развитие и рост опухолей, а объем опухоли можно измерять еженедельно в течение выбранного периода исследования, например 14-дневного периода исследования. Преимущественно результаты покажут 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более кратное увеличение роста опухолей у контрольных мышей по сравнению с мышами, получавшими антитела в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно в течение периода лечения рост опухоли у мышей, получавших антитела в соответствии с изобретением, будет незначительным. Такие данные могут подтвердить, что тестируемое гуманизованное антитело эффективно подавляет рост опухоли в этой ксенотрансплантатной модели В-лимфомы мыши.

Пример 8. Пролонгированное выживание за счет гуманизованного антитела против CD40.

Эффективность гуманизованного антитела против CD40 в отношении выживаемости мышей с опухолью, таких как описанные выше, можно оценить на ксенотрансплантатной модели лимфомы мыши SCID. Мышам SCID (10/группу) внутривенно прививают 1×10^6 миллионов опухолевых клеток за три дня до лечения антителами. Затем мышам вводят мышинные или гуманизованные антитела против CD40 в соответствии с настоящим изобретением или контрольный Ig, которые вводят внутривенно два раза в неделю (4 мг/кг/дозу), всего пять доз. Затем клетки для мышей можно исследовать ежедневно на предмет смертности, чтобы определить уровень эффективности антител в пролонгировании выживаемости субъекта, имеющего рак.

В настоящем документе процитированы различные ссылки, включая заявки на патенты, патенты и научные публикации, описания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Цитирование или идентификация любой ссылки в настоящем документе не должны быть истолкованы как признание того, что такая ссылка доступна в качестве предшествующего уровня техники для настоящего изобретения.

Пример 9. Безопасность, фармакокинетика и фармакодинамика многократных возрастающих доз антитела в соответствии с настоящим изобретением, антагонистического антитела против CD40 у здоровых субъектов: Возможное новое лечение аутоиммунных заболеваний.

Целью этого рандомизированного плацебо-контролируемого двойного слепого исследования было определение безопасности, переносимости, фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики (ФД) 4-недельного повторного подкожного введения один раз в неделю в дозах 80, 120, 180 или 240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением у здоровых субъектов.

Методы.

Дизайн исследования.

Это исследование фазы 1 было одобрено Независимым комитетом по вопросам этики участвующего центра и органами здравоохранения Новой Зеландии, и все участники предоставили информированное согласие. Исследование было спонсировано компанией Boehringer Ingelheim и проведено в единст-

венном исследовательском центре в Окленде, Новая Зеландия, компанией Auckland Clinical Studies Ltd.

Исследование представляло собой рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое групповое исследование в пределах дозы.

Несколько возрастающих подкожных доз 80-240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением тестировали на здоровых субъектах один раз в неделю в течение 4-недельного периода лечения.

Дозы были выбраны исходя из данных о безопасности, ФК и ФД из исследования однократного повышения дозы. В этом исследовании максимальная испытанная внутривенная доза (120 мг) хорошо переносилась и обеспечивала в 7 раз более высокую максимальную наблюдаемую концентрацию (C_{max}) и в 3 раза большую площадь под кривой зависимости концентрации от времени (AUC), чем испытанная 120 мг подкожная доза. Основываясь на этих данных ФК, было вычислено, что экспозиция от дозы 120 мг внутривенно в исследовании однократной возрастающей дозы покрывает экспозицию, ожидаемую при дозе 240 мг подкожно.

Подходящие субъекты были рандомизированы для получения антитела в соответствии с настоящим изобретением или плацебо в соотношении 4:1 с помощью инструмента Interactive Response Technology в четырех последовательных группах по дозам подкожно (80, 120, 180 и 240 мг), причем группы доз разделены по меньшей мере на 7 дней. Каждая группа доз состояла из 10 субъектов (8 активных, 2 плацебо) (фиг. 1). Решение о повышении до следующего уровня дозы было принято независимым комитетом по мониторингу данных на основании оценки безопасности, переносимости, данных ФК и ФД.

Все субъекты получили последнюю дозу лечения на 22 день. За субъектами в группах с подкожной дозой 80, 120 и 180 мг наблюдали в течение 42 дней после их последней дозы, и общая продолжительность исследования составила 64 дня. За субъектами в группе, получавшей подкожную дозу 240 мг, наблюдали в течение 56 дней, а общая продолжительность исследования составила 78 дней.

Субъекты, исследователи и спонсорский персонал оставались не осведомленными об исследуемом лечении. Первоначальное закрытие доступа к базе данных было выполнено после того, как пациенты в группах с подкожной дозой 80-180 мг завершили исследование, и все данные были открыты после завершения группы с подкожной дозой 240 мг.

Образцы крови (2,7 мл) для ФК анализа отбирали из вены предплечья с использованием постоянного катетера в пробирки с антикоагулянтом - трикальевой солью этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Образцы собирали до и после введения дозы через 1, 8 и 12 ч, а также в дни 1, 2, 3 (утром и вечером, с интервалом 12 ч), 4 (утром и вечером, с интервалом 12 ч), 5, 6, 7 (до второй дозы), 14 (до третьей дозы), 21 (до четвертой дозы и через 1 и 12 ч после четвертой дозы), 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 34, 38, 42, 49, 56, 63 (только группа с дозой 80-180 мг) и 77 (только группа с дозой 240 мг) после первой дозы.

Образцы крови для оценки антител (ADA) в сравнении с антителами в соответствии с настоящим изобретением были взяты до введения дозы и после первой дозы на 21-е сутки (до четвертой дозы), 38, 63 (только для групп с дозой 80-180 мг) и 77 (только группа с дозой 240 мг) после первой дозы.

В течение 30 мин после сбора образцов, образцы крови сразу же помещали на лед после сбора и центрифугировали при 4°C в течение 10 мин. Плазму переносили в два полипропиленовых флакона для образцов (по 0,5 мл каждый) и хранили при -20°C перед отправкой в аналитическую лабораторию.

Образцы крови (4,9 мл) для анализа ФД были собраны из вены предплечья с использованием постоянного катетера в пробирки с гепариновым антикоагулянтом, до введения дозы и в дни 3, 7 (перед второй дозой), 21 (перед четвертой дозой), 24, 28, 38, 63 (только для группы с дозой 80-180 мг) и 77 (только для группы с дозой 240 мг) после первой дозы и были немедленно доставлены в лабораторию для анализа. Валидация анализов на повышенную регуляцию CD40 RO и CD54 показала, что перед анализом цельную кровь можно оставить при комнатной температуре на срок до 24 ч и 6 ч соответственно.

Участники исследования.

В исследование были включены подходящие субъекты в возрасте от 18 до 60 лет с индексом массы тела от 18,5 до 29,9 кг/м². Участницы женского пола должны были находиться в постменопаузе, подвергаться хирургической стерилизации, воздерживаться от полового акта, иметь вазэктомированного сексуального партнера или практиковать принятые методы контрацепции в течение ≤30 дней до введения исследуемого лекарственного средства и в течение 30 дней после завершения исследования, а результаты теста на беременность были отрицательными, и во время исследования.

Субъекты были исключены, если у них были какие-либо доказательства клинически значимых отклонений, выявленных при медицинском обследовании или лабораторных исследованиях; сопутствующее заболевание; любые желудочно-кишечные, печеночные, почечные, респираторные, сердечно-сосудистые, метаболические, иммунологические или гормональные нарушения; заболевание центральной нервной системы; ортостатическая гипотензия, обмороки или временная потеря сознания; или аллергии или реакции гиперчувствительности к лекарственным средствам. Также были исключены субъекты, если они принимали какие-либо другие лекарственные средства с длительным периодом полувыведения ($t_{1/2}$; >24 ч) в течение 30 дней или менее 10 периодов полувыведения до рандомизации; принимали лекарственные средства, которые могли повлиять на результаты исследования, в течение 10 дней до первого дня приема в исследовании; получали какое-либо исследуемое лекарственное средство в течение

60 дней до первого дня дозирования исследования; были донорами крови в течение 30 дней до первого дня приема дозы в исследовании; имелось доказательство злоупотребления наркотиками или чрезмерного употребления алкоголя или сигарет; положительный результат теста на вирус иммунодефицита человека, гепатита В, гепатита С, туберкулез, или хроническую или острую инфекцию; было намерение начать новый режим упражнений в течение 1 недели до первого дня приема дозы в исследовании. Также были исключены кормящие грудью женщины или женщины, которые планировали забеременеть в течение 30 дней после завершения исследования.

Аналитические методы.

Концентрации антитела в соответствии с настоящим изобретением в плазме анализировали с использованием утвержденного сэндвич-твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с нижним пределом количественного определения 30 нг/мл. 96-луночные микротитрационные планшеты сначала покрывали антителом, сравнимым с антителом в соответствии с настоящим изобретением, блокировали и промывали. Затем планшеты инкубировали с исследуемыми образцами, калибраторами или образцами контроля качества и снова промывали. Связывание антитела в соответствии с настоящим изобретением детектировали с помощью биотинилированного антитела в сопоставлении с антителом в соответствии с настоящим изобретением, затем стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, и, наконец, с субстратом пероксидазы тетраметилбензидин. Планшеты считывали колориметрически и данные анализировали с помощью 5-параметрической логистической подгонки. Количественный диапазон составлял 30-800 нг/мл. Адекватную точность и прецизионность оценивали во время рутинного анализа с образцами контроля качества в трех концентрациях - низкой (50 или 100 нг/мл), средней (126 или 200 нг/мл) и высокой (500 или 590 нг/мл). Воспроизводимость ELISA была проверена повторным анализом образцов, в котором 93% образцов соответствовали критериям приемлемости (отклонение $\leq 30\%$ от среднего).

Антитела в соответствии с настоящим изобретением анализировали в образцах плазмы, с использованием валидированного метода мостиковой электрохемилюминесценции. Все представленные данные об образцах соответствовали критериям приемлемости для конкретного анализа. Валидация анализа ADA показала, что 250 нг/мл антитела ADA положительного контроля может быть обнаружено в присутствии концентраций в плазме 50 мкг/мл антитела в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, истинно положительный ответ у субъекта был охарактеризован с помощью дополнительных анализов количественного определения титров. Титры определяли путем анализа серийных 2-кратных разведений образца. Сообщенные титры были наивысшим кратным разбавлением, которое давало среднее значение электрохемилюминесценции, которое было больше или равно точке отсечения для планшета.

Как определение концентраций антител в соответствии с настоящим изобретением, так и оценки ADA были выполнены в Covance Laboratories, Inc. (Шангилли, Вирджиния, США).

Для измерения CD40 RO, образцы цельной крови инкубировали с избытком меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитело в соответствии с настоящим изобретением и аллофикоцианина против CD19 (APC; для стробирования В-клеток) в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Добавляли лизирующий раствор для сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS), и пробирки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте с последующим центрифугированием (1300 об/мин) при 4°C в течение 6 мин и удалением супернатанта. Добавляли CellFix и пробирки встряхивали и хранили при 4°C в темноте до анализа FACS, который выполняли в течение 24 ч после добавления CellFix. Во время измерений все образцы держали на льду.

Для измерения ингибирования повышенной регуляции CD54 цельную кровь инкубировали либо с одним интерлейкином-4 (IL-4) - "нестимулированными пробирками FACS", либо с MegaCD40L + IL-4 - "стимулированными пробирками FACS". Пробирки встряхивали и инкубировали в темноте при 37°C в увлажненном инкубаторе в течение 23-26 ч. Анти-CD19-APC и анти-CD54-фикоэритрин (PE) добавляли в каждую пробирку и пробирки встряхивали и инкубировали в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Добавляли лизирующий раствор FACS и пробирки инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте с последующим центрифугированием (1300 об/мин) при 4°C в течение 6 мин и удалением супернатанта. Добавляли CellFix и пробирки встряхивали и хранили при 4°C в темноте до анализа FACS, который выполняли в течение 2 ч после добавления CellFix. Во время измерений все образцы держали на льду.

Как с CD40 RO, так и с CD54 анализы повышенной регуляции были квазиколичественными. Результаты анализа основывались на процентном изменении (т.е. образцы во время лечения были связаны с образцом до введения дозы).

Чтобы изучить возможность тромбоэмболических событий, были выполнены следующие оценки: международное нормализованное отношение протромбинового времени (PT-INR), активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), антитромбин III, фибриноген, S и C белки, количество тромбоцитов, время кровотечения (измерено методом Дюка) и D-димеры.

Фармакокинетическая оценка.

Данные "концентрация в плазме - время" для антитела в соответствии с настоящим изобретением

анализировали некомпартментным подходом с использованием WinNonlin™ (версия 5.02, Gary, NC, США). Определенные параметры включали: C_{\max} , время достижения C_{\max} (t_{\max}), конечную константу элиминации (λz) и конечное $t_{1/2}$ с использованием стандартной процедуры WinNonlin™. Площадь под кривой концентрация - время в течение равномерного интервала дозирования τ ($AUC_{0-\tau}$) после последней (четвертой) дозы рассчитывали с использованием алгоритма WinNonlin™ с линейным увеличением и уменьшением. Коэффициенты накопления (RA , C_{\max} на основе C_{\max} ; RA , AUC на основе $AUC_{0-\tau}$) рассчитывали как отношение значения после четвертой дозы к значению после первой дозы.

Фармакодинамическая оценка.

Фармакодинамическая оценка включала оценку CD40 RO с помощью антитела в соответствии с настоящим изобретением и ингибирование активации В-клеток, как измерено по индуцированной megaCD40L повышенной регуляции CD54 в цельной крови с использованием вышеупомянутых валидированных анализов FACS. Взаимосвязь между дозой антитела в соответствии с настоящим изобретением и ингибированием CD40 RO и повышенной регуляцией CD54 ранее была исследована с использованием стандартных сигмоидальных моделей E_{\max} и описана в Albach и соавт. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2018; 74(2):161-169.

Безопасность и переносимость.

Безопасность и общую переносимость антитела в соответствии с настоящим изобретением оценивали путем мониторинга вызванных лечением побочных реакций (ПР), физических обследований, показателей жизненно важных функций (артериального давления и пульса), электрокардиограммы в 12 отведениях (ECG) и клинических лабораторных тестов (анализ крови, биохимический анализ и анализ мочи).

Статистический анализ.

Формального определения размера выборки не осуществляли: 8 субъектов в каждой дозовой группе считались достаточными для анализа фармакокинетики и безопасности. Результаты исследования были проанализированы с использованием описательной статистики безопасности, ФК и ФД. Популяция безопасности включала всех субъектов, которые получали исследуемое лекарственное средство (антитело в соответствии с настоящим изобретением или плацебо). Популяции ФК и ФД включали всех субъектов, которые получали исследуемое лекарственное средство и предоставили поддающиеся оценке данные для анализа ФК и ФД соответственно. Пропорциональность дозе $AUC_{0-\tau}$ и C_{\max} после четвертой дозы оценивали с использованием степенной модели. Был вычислен 95% доверительный интервал (ДИ) для наклона. Идеальная пропорциональность дозы была определена параметром наклона (β) равным 1. Для оценки того, было ли достигнуто установившееся состояние, был проведен описательный анализ, включая графическое представление данных о концентрации.

Результаты.

Субъекты.

В общей сложности 40 здоровых субъектов были рандомизированы и пролечены в ходе исследования. Субъекты получали повторное подкожное лечение один раз в неделю посредством плацебо ($n=8$), 80 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением ($n=8$), 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением ($n=8$), 180 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением ($n=8$) или 240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением ($n=8$) в течение 4-недельного периода. Все 40 субъектов завершили запланированный период наблюдения, и преждевременных прекращений не было. Большинство субъектов были мужского пола (83%) и белыми (73%), со средним (стандартное отклонение [SD]) возрастом 30 (10,8) лет и средним (SD) индексом массы тела 25 (3.1) кг/м². Между группами лечения не было значимых демографических различий.

Фармакокинетика.

Среднее геометрическое ($gMean$) выбранных ФК параметров для антитела в соответствии с настоящим изобретением после введения первой подкожной дозы (день 1) и последней подкожной дозы (четвертой) представлено в табл. 9. После первой дозы медиана t_{\max} увеличивалась с каждой недельной дозой, но t_{\max} не показывало какой-либо четкой дозовой зависимости после четвертой дозы ($t_{\max, 4}$). Максимальная концентрация в плазме и AUC , нормализованные для введенной дозы ($C_{\max, \text{norm}, 4}$ и $AUC_{\tau, \text{norm}, 4}$ соответственно), были ниже для группы с дозой 80 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением и аналогичны для трех групп с более высокой дозой, что позволяет предположить более чем пропорциональное увеличение экспозиции с 80 до 120 мг, но почти пропорциональную дозу кинетику для доз >120 мг. C_{\max} или AUC ($R_{A, C_{\max}, 4}$ и $R_{A, AUC, 4}$ соответственно) определяли для оценки накопления антитела в соответствии с настоящим изобретением после четырех многократных доз. После четырех подкожных один раз в неделю доз в 80 мг значения $R_{A, C_{\max}, 4}$ и $R_{A, AUC, 4}$ были в 8,3- и 11,6 раз выше соответственно, чем после однократной дозы, что указывает на накопление антитела в соответствии с настоящим изобретением. Накопление $gMean$ было ниже для трех более высоких доз (диапазон: 3,7-4 для $R_{A, C_{\max}, 4}$ и 4,9-5,8 для $R_{A, AUC, 4}$). Конечный $t_{1/2}$ антитела в соответствии с настоящим изобретением находится в диапазоне от 156 до 199 ч (6-8 дней). Визуальный осмотр минимальных концентраций показал, что стабильное состояние не было достигнуто ни для одной из доз: минимальные концентрации в плазме для всех групп продолжали увеличиваться с каждой последующей дозой (фиг. 2).

Таблица 9

Избранные ФК параметры антитела в соответствии с настоящим изобретением после первой дозы (день 1) и последней дозы (после 4 подкожных введений один раз в неделю)

	ВІ 655064			
	80 мг (n = 8)	120 мг (n = 8)	180 мг (n = 8)	240 мг (n = 8)
После первой дозы				
C_{max} , мкг/мл	1.6 (492)	7.7 (29.5)	9.9 (67.8)	18.0 (46.3)
$C_{max, норм}$, мкг/мл/мг	0.02 (492)	0.06 (29.5)	0.05 (67.8)	0.08 (46.3)
t_{max} , ч	66 (12-168)	78 (48-108)	108 (72-144)	156 (108-168)
$AUC_{0-\tau}$ ^a , мкг·ч/мл	154 (683)	850 (34.4)	919 (78.9)	1630 (42.6)
$AUC_{0-\tau, норм}$, мкг·ч/мл/мг	1.9 (683)	7.1 (34.4)	5.1 (78.9)	6.8 (42.6)
После четвертой дозы ^a				
$C_{max, 4}$, мкг/мл	13.1 (59.1)	28.7 (35.6)	39.8 (37.4)	68.4 (21.9)
$C_{max, норм, 4}$, мкг/мл/мг	0.16 (59.1)	0.24 (35.6)	0.22 (37.4)	0.29 (21.9)
$t_{max, 4}$, ч	96.0 (96-144)	84.1 (12-144)	96.0 (72-192)	108 (96-504)
$AUC_{0-\tau, 4}$ ^b , мкг·ч/мл	1790 (56.4)	4140 (35.4)	5470 (37.4)	9460 (22.4)
$AUC_{0-\tau, норм, 4}$, мкг·ч/мл/мг	22.3 (56.4)	34.5 (35.4)	30.4 (37.4)	39.4 (22.4)
$t_{1/2, 4}$, ч	186 (39.4)	156 (28.3)	171 (39.6)	199 (28.4)
$R_{A, C_{max, 4}}$	8.3 (226)	3.7 (31.9)	4.0 (46.9)	3.8 (23.4)
$R_{A, AUC, 4}$ ^c	11.6 (289)	4.9 (27.7)	6.0 (45.3)	5.8 (25.4)

Данные представлены как среднее геометрическое (геометрический коэффициент вариации, %) за исключением данных для t_{max} , которые представлены как медиана (диапазон).

^aФК параметры, проанализированные после четвертой дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением, обозначены надстрочным индексом 4 (например, $t_{max, 4}$);

^b $AUC_{0-\tau}$ является синонимом $AUC_{0-168 ч}$;

^c $R_{A, AUC}$ равна $AUC_{0-\tau}$ после четвертой дозы, деленной на $AUC_{0-\tau}$ после первой дозы.

Анализ пропорциональности доз в диапазоне подкожных доз 80-240 мг показал, что наклон для C_{max} и $AUC_{0-\tau}$ значительно отличался от единицы, указывая на то, что воздействие антитела в соответствии с настоящим изобретением не было пропорционально дозе (C_{max} : наклон степенной модели $\beta=2.1$ [95% CI 1.2-2.9] после первой дозы; наклон $\beta=1.4$ [95% CI 1.1-1.8] после последней дозы; $n=32$; $AUC_{0-\tau}$: наклон $\beta=1.4$ [95% CI 1.1-1.8] после последней дозы; $n=32$). Однако для более высоких доз (120-240 мг) наблюдали тенденцию к пропорциональности дозы.

Фармакодинамика.

Введение антитела в соответствии с настоящим изобретением привело к дозозависимому CD40 RO и ингибированию повышенной регуляции CD54 (фиг. 3).

После однократной подкожной дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением среднее арифметическое CD40 RO уже достигло почти максимальных значений для каждого уровня дозы при первом измерении после введения дозы (72 ч) (фиг. 3A). В этот момент времени доза 80 мг привела к примерно 89% CD40 RO. Для групп, получавших дозу 120-240 мг, CD40 RO стабилизировался на уровне 94-95%; поскольку это был предел обнаружения для анализа, было невозможно определить, достижимы ли более высокие уровни занятости. Эти уровни CD40 RO были сохранены до конца исследования.

После последнего (четвертого) еженедельного подкожного введения антитела в соответствии с настоящим изобретением CD40 RO составлял >90% во все измеренные моменты времени до 39 дня (17 дней после последнего введения) для всех доз (80-240 мг). Для группы, получавшей дозу 180 мг, 79% (геометрический коэффициент вариации [gCV] 23%), CD40 RO все еще определялся на 64-й день, а для группы, получавшей дозу 240 мг, 68% (gCV 29%) CD40 RO было определено на 78-й день, что указывает на долгосрочное постоянное связывание с рецептором, хотя вариабельность была выше в эти более поздние моменты времени. В группе плацебо не наблюдали заслуживающего внимания CD40 RO.

Ингибирование повышенной регуляции CD54 после введения однократной дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением следовало по схеме, аналогичной наблюдаемой для CD40 RO, с дозой 80 мг, обеспечивающей 87% ингибирование при первом измерении после введения дозы (72 ч), и >90% ингибирование, наблюдаемое для более высоких доз в этот момент времени (все группы доз; фиг. 3B). Для группы, получавшей дозу 80 мг, ингибирование увеличивалось далее до 95% на 7-й день после введения дозы, тогда как для всех других доз 95% ингибирование наблюдали после 72 ч; в группе плацебо ингибирование повышенной регуляции CD54 варьировало между -20 и 30%. После последнего (четвертого) еженедельного подкожного введения антитела в соответствии с настоящим изобретением ингибирование повышенной регуляции CD54 составляло >90% для всех доз до 39 дня (17 дней после последнего введения). Ингибирующий эффект все еще обнаруживался для группы с дозой 180 мг (89% на 64-й день) и для группы с дозой 240 мг (51% на 78-й день).

Безопасность.

Общая частота и интенсивность ПР были сходными в группах лечения антителами в соответствии с настоящим изобретением (все дозы антител в соответствии с настоящим изобретением [78%] и группа плацебо [88%]). Не было сообщено о серьезных ПР, тяжелых ПР или ПР, приводящих к прекращению приема или смерти. Хотя количество субъектов было невелико, не было обнаружено какой-либо взаимосвязи между дозой антитела в соответствии с настоящим изобретением, связанными с лечением ПР или частотой и интенсивностью ПР. Об инфекциях сообщалось у 8 субъектов (25%), получавших антитело в соответствии с настоящим изобретением, и у 5 субъектов (63%), получавших плацебо. Тромбоэмболических явлений не было. Наиболее частым нежелательным явлением, связанным с лечением, была головная боль у 4 субъектов (13%), получавших антитело в соответствии с настоящим изобретением, и 2 субъектов (25%), получавших плацебо. Все ПР были легкой или средней степени выраженности, и все они были устранены.

Для отдельных субъектов в группах лечения 80 и 120 мг значительное повышение креатинкиназы (СК) наблюдалось как на исходном уровне, так и после лечения или антителом в соответствии с настоящим изобретением, или плацебо (диапазон 1,1-88 раз выше верхнего предела нормы [ULN]). В целом, было определено, что такое повышение СК в основном связано с интенсивными физическими упражнениями. Введение более строгих ограничений физических нагрузок для групп с более высокими дозами (180-240 мг) привело к снижению уровней СК (максимум 3-кратный ULN).

Из всех субъектов, получавших антитело в соответствии с настоящим изобретением, легкая и преходящая лейкопения и нейтропения наблюдались у 12 (37,5%) и 14 (43,8%) субъектов соответственно. Только у 1 субъекта, получавшего плацебо, была легкая и преходящая нейтропения. Значения ниже нижнего предела нормы (LLN) наблюдали у 4 из 12 субъектов (33,3%) с легкой преходящей лейкопенией и у 5 из 14 субъектов (35,7%) с легкой преходящей нейтропенией до начала лечения. У всех субъектов лейкоциты (WBC) и абсолютное количество нейтрофилов вернулись к нормальным значениям (нормальный диапазон WBC: $4-11 \times 10^9/\text{л}$ и абсолютный нормальный диапазон нейтрофилов: $1,9-7,5 \times 10^9/\text{л}$) или достигли уровня до лечения к концу исследования, за исключением 1 субъекта с количеством WBC $3,77 \times 10^9/\text{л}$ на момент окончания исследования и еще другого субъекта с низким количеством WBC и абсолютным количеством нейтрофилов $3,58 \times 10^9/\text{л}$ и $1,69 \times 10^9/\text{л}$ соответственно во время визита окончания исследования. Более того, не наблюдалось увеличения числа субъектов с лейкопенией или нейтропенией при увеличении дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Не было клинически значимых изменений времени кровотечения, количества тромбоцитов или параметров коагуляции, включая D-димеры, антитромбин III, фибриноген и белки S и C.

Не было клинически значимых результатов или различий в лечении между группами в отношении показателей жизнедеятельности, ЭКГ или физических обследований. Оценка местной переносимости показала, что все дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением хорошо переносились, и не было различий по сравнению с группой плацебо.

Ранее существовавшие реакции ADA наблюдали у 4 субъектов (10%), 3 из которых впоследствии получали антитела в соответствии с настоящим изобретением, а 1 получал плацебо. Титр ADA был увеличен только у 1 из этих субъектов, получавших дозу 240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением (усиленные лечением ADA [ранее существовавшие ADA, которые были повышены до более высокого уровня после биологического введения]).

Сероконверсию наблюдали у 16 субъектов (50%) после лечения антителом в соответствии с настоящим изобретением; начало было в основном в выборках по окончании исследования (15 субъектов

[47%]). В то время уровни антитела в соответствии с настоящим изобретением были уже очень низкими (gMean концентрации антитела в соответствии с настоящим изобретением в плазме варьировались от 0,182-10,5 мкг/мл для групп с дозой 80-240 мг).

Вызванные лечением ADA (ADA, выработанные de novo после биологического введения) или усиленные лечением ответные реакции на ADA наблюдали у 5 субъектов (62,5%) в группе дозы 80 мг и 6 субъектов (75%) в группе дозы 120 мг. Общие медианные титры в группах с дозой 80 и 120 мг составляли 20 и 8 соответственно. Вызванные лечением или усиленные лечением ответные реакции на ADA наблюдали у меньшего числа субъектов в группах с более высокими дозами; 2 (25%) и 4 (50%) субъекта в группах с дозой 180 и 240 мг соответственно с общими средними титрами 4 и 8 соответственно. Максимальный титр у отдельного субъекта составлял 640, что наблюдалось в группе, получавшей дозу 120 мг.

Обсуждение.

Цели этого исследования состояли в том, чтобы изучить эффекты 4-недельных повышающихся подкожно вводимых доз антитела в соответствии с настоящим изобретением (80-240 мг в неделю) у здоровых субъектов. Оценка ФК параметров показала почти пропорциональную кинетику для подкожных доз 120-240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением, но сверхпропорциональную кинетику для подкожных доз 80-120 мг из-за опосредованного мишенью клиренса лекарственного средства, как наблюдали в предыдущем исследовании после однократных внутривенных доз антитела в соответствии с настоящим изобретением. Эффект усиливается за счет широкого распределения рецепторов CD40 (особенно тромбоцитов с их коротким $t_{1/2}$), о чем ранее сообщалось в других исследованиях с антагонистическими антителами против CD40. Наблюдали почти пропорциональную зависимость доза-содержание в диапазоне подкожных доз 120-240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением для C_{max} (после первой и последней доз) и для $AUC_{0-\tau}$ (после последней дозы), с наклоном $\beta=1,2$ для обоих параметров, возможно указывая на то, что CD40 RO приближается к насыщению при этих дозах. Содержания в плазме крови, достигнутые в этом исследовании после первых подкожных доз 80 и 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением были аналогичны тем, которые наблюдали в предыдущем исследовании однократного увеличения дозы у здоровых добровольцев, где средние значения gMean AUC 120 и 888 мкг/ч/мл были получены после однократной подкожной дозы 80 и 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением соответственно. Накопление антитела в соответствии с настоящим изобретением наблюдали при всех уровнях доз после многократного введения по сравнению с введением однократной дозы (первая доза). Тем не менее меньшее накопление наблюдали для доз 120-240 мг, с относительно постоянными значениями gMean R_A , C_{max} от 3,7 до 4 и значениями gMean R_A , AUC от 4,9 до 6. Стабильное состояние не было достигнуто в течение 4-недельного периода для любой из введенных доз. Моделирование показало, что для достижения устойчивого состояния может потребоваться до 12 недель при дозировке 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением один раз в неделю (неопубликованное находится в стадии подготовки). Прогноз достижения устойчивого состояния в течение примерно 12 недель был подтвержден лечением пациентов с ревматоидным артритом посредством 120 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением подкожно один раз в неделю в течение 12 недель, демонстрируя, что ФК устойчивого состояния достигается в течение примерно 10-12 недель. Таким образом, это обосновывает применение ударной дозы для более быстрого достижения устойчивого состояния в будущих клинических исследованиях. Для параметров содержания AUC и C_{max} индивидуальная вариабельность была выше для дозы 80 мг (gCVs: 56,4-59,1%), умеренной для доз 120 и 180 мг (gCVs: 35,4-37,4%) и ниже для дозы 240 мг (gCVs: 21,9-22,4%). Антитело в соответствии с настоящим изобретением медленно абсорбировалось из места подкожной инъекции, при этом среднее значение t_{max} увеличивалось с дозой после первой дозы; после четвертой дозы не было зависимости между дозами и $t_{max,4}$. После введения нескольких доз антител в соответствии с настоящим изобретением расчетный конечный $t_{1/2}$ находился в диапазоне от 6 до 8 дней без видимой разницы между дозами.

Оценка CD40 RO и ингибирование повышенной регуляции CD54 показала, что однократные подкожные дозы от 120 до 240 мг антитела в соответствии с настоящим изобретением приводят к >90% CD40 RO и >90% ингибированию повышенной регуляции CD54 через 72 ч после введения дозы. После последней (четвертой) дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением >90% CD40 RO и ингибирование повышенной регуляции CD54 сохранялись по меньшей мере в течение 408 ч (17 дней) после дозирования в диапазоне подкожных доз 80-240 мг. Эти результаты предполагают возможность непрерывного полного ингибирования агонистического лигирования CD40 при подкожном введении антитела в соответствии с настоящим изобретением. Моделирование показало, что дозировка антитела в соответствии с настоящим изобретением 120 мг подкожно один раз в неделю в течение 3 недель с последующим введением один раз каждую вторую неделю приведет к непрерывному >90% CD40 RO. Ожидается, что у пациентов с воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, системная красная волчанка или волчаночный нефрит, рецептор CD40 будет высоко экспрессироваться и активироваться на различных иммунных клетках и резидентных клетках (например, мезангиальных клетках при волчаночном нефрите); таким образом, для полного блокирования рецептора CD40 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями могут потребоваться более высокие дозы антитела в соответствии с настоящим изобрете-

нием, чем те, которые приводят к 90% занятости рецептора В-клетками у здоровых субъектов. Клинические исследования антитела в соответствии с настоящим изобретением у этих пациентов должны будут оценить, могут ли более длительные интервалы дозирования достичь клинической эффективности или необходимо еженедельное введение дозы.

Возрастающие многократные подкожные дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением были признаны безопасными и показали хорошую общую переносимость у здоровых субъектов. Все ПР были легкой или умеренной степени выраженности и не было сообщено о ПР, которые привели бы к прекращению участия в исследовании. Значения сывороточного СК, превышающие верхнюю границу нормы, были зарегистрированы у некоторых субъектов на исходном уровне и после лечения как в группе антител в соответствии с настоящим изобретением, так и в группах плацебо, но это было связано с чрезмерной физической нагрузкой; аналогично тому, о чем ранее сообщалось в литературных источниках. Введение более строгих ограничений на физические упражнения для групп с дозой 180 и 240 мг привело к снижению концентрации СК. У нескольких субъектов наблюдалась легкая и преходящая лейкопения и нейтропения после лечения антителом в соответствии с настоящим изобретением. Однако значения ниже LLN уже наблюдались до лечения у 33,3% субъектов с лейкопенией и соответственно у 35,7% пациентов с нейтропенией. Преходящая нейтропения очень часто встречается у здоровых людей и в некоторых случаях связана с сопутствующими вирусными инфекциями. Ранее сообщалось о нейтропении у субъектов, занимающихся высокоинтенсивными видами спорта, и большинство субъектов, включенных в это исследование, выполняли интенсивные физические нагрузки, что подтверждается наблюдаемым значительным повышением значений СК в сыворотке. Кроме того, недавно было показано, что повреждение мышц, вызванное физической нагрузкой, вызывает быструю местную воспалительную реакцию, и что локальное накопление лейкоцитов связано со слабостью мышц. Повышенные уровни СК, наблюдаемые в этом исследовании, указывают на то, что у этих субъектов были некоторые мышечные повреждения; следовательно, перераспределение лейкоцитов из кровотока в сторону мышц могло способствовать наблюдаемой преходящей лейкопении и нейтропении. В целом, нет четкой взаимосвязи между наблюдаемой нейтропенией и лечением антителом в соответствии с настоящим изобретением. Однако изменения лейкоцитов и нейтрофилов будут тщательно контролироваться в последующих клинических исследованиях с антителом, предлагаемым в настоящем изобретении.

Не сообщалось о клинически значимых жизненно важных функциях, оценке ЭКГ или результатах физического обследования. В соответствии с наблюдениями после введения однократных внутривенных и подкожных доз антитела в соответствии с настоящим изобретением, не было сообщений о тромбоэмболических событиях при многократном введении, и не было клинически значимых изменений в параметрах тромбоцитов или коагуляции. Ранее исследование агрегометрии тромбоцитов и исследований связывания с тромбоцитами человека показало, что блокирование CD40 не оказывает очевидного влияния на функцию тромбоцитов (неопубликованные данные); в токсикологических исследованиях было продемонстрировано, что антитело в соответствии с настоящим изобретением, связанное с тромбоцитами у яванских макаков, не влияло на количество или функцию тромбоцитов. В целом, эти результаты показывают, что при связывании с тромбоцитами антитело в соответствии с настоящим изобретением, по-видимому, не изменяет активацию, агрегацию или функцию тромбоцитов. Эти данные, а также данные по другим антителам против CD40 или против CD40L, лишенным функциональной области Fc, 17, 19, 20 подтверждают интерпретацию, согласно которой можно избежать риска тромбоэмболических событий, как наблюдалось с более ранними антителами против CD40L, 16 можно избежать, устранив Fc-функцию антител.

Вызванные лечением или усиленные лечением ответы ADA у 50% субъектов, получавших антитело в соответствии с настоящим изобретением, не вызывали каких-либо клинических симптомов (нет связи с ПР или изменением содержания) или приводили к наблюдаемым изменениям ФК после нескольких доз. Количество лейкоцитов и нейтрофилов не изменилось, и было в пределах нормы или достигло уровней до лечения, за исключением двух субъектов (эти два субъекта были отрицательными для ADA). Было больше случаев ADA в группах с дозировкой 80 и 120 мг, чем в группах с более высокими дозами (180 и 240 мг). Концентрации антитела в соответствии с настоящим изобретением в плазме крови были близки к нижнему пределу количественной оценки анализа во время начала ответа на ADA (визит в конце исследования); антитело в соответствии с настоящим изобретением было в значительной степени элиминировано, и уровни циркулирующего антитела в соответствии с настоящим изобретением были ниже переносимости лекарственного средства анализа ADA. Кроме того, небольшое количество субъектов в этом исследовании не позволяло окончательно оценить дозу антитела в соответствии с настоящим изобретением или проявление или титр ADA. Основываясь на механизме антитела в соответствии с настоящим изобретением, ингибирующего рецепторы CD40 и, таким образом, блокирующего продукцию антител, возникновение ADA после введения антитела в соответствии с настоящим изобретением и переключения изотопа антитела не ожидается. В момент времени 1512 ч (63 дня) (группы с дозой 80-180 мг) или 1848 ч (77 дней) (группа с дозой 240 мг), CD40 RO уже снизился ниже 90%.

Более того, ожидается, что уровни антител в соответствии с настоящим изобретением будут еще ниже в зародышевых центрах; таким образом, концентрации антитела в соответствии с настоящим изобретением

бретением могли быть слишком низкими, чтобы блокировать образование ADA. Эта гипотеза также подтверждается доклиническими оценками антител в соответствии с настоящим изобретением на яванских макаках, где все дозы показали >90% CD40 RO для периферических В-клеток, но самая низкая группа (1 мг/кг) не показала полный фармакологический эффект на зародышевых центрах и выработанные ADA (21 и неопубликованные данные).

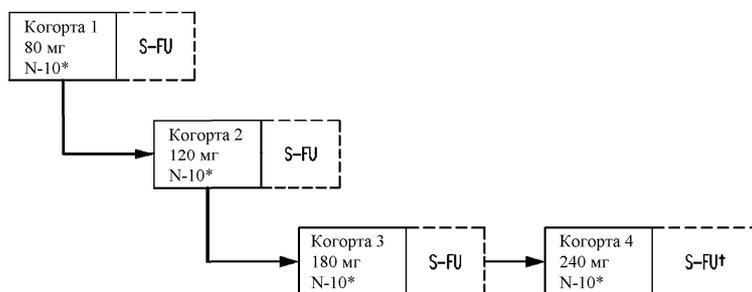
Заключение.

После возрастающих многократных еженедельных подкожных доз антитела в соответствии с настоящим изобретением в течение 4-недельного периода у здоровых субъектов, ФК увеличивалась непропорционально из-за опосредованного мишенью клиренса для доз от 80 до 120 мг, но была почти пропорциональна для доз >120 мг. Дозозависимое накопление антитела в соответствии с настоящим изобретением поддерживает использование ударной дозы для более быстрого достижения устойчивого состояния в будущих клинических исследованиях. Антитело в соответствии с настоящим изобретением продемонстрировало высокий потенциал блокирования пути CD40-CD40L, с постоянным ингибированием CD40L-индуцированной повышенной регуляции CD54. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить, может ли более длительный интервал введения дозы быть клинически эффективным у пациентов, страдающих аутоиммунным заболеванием, таким как ревматоидный артрит, системная красная волчанка или волчаночный нефрит. Возрастающие многократные подкожные дозы антитела в соответствии с настоящим изобретением в диапазоне 80-240 мг обычно хорошо переносились, и не наблюдалось соответствующих признаков острой иммунной реакции.

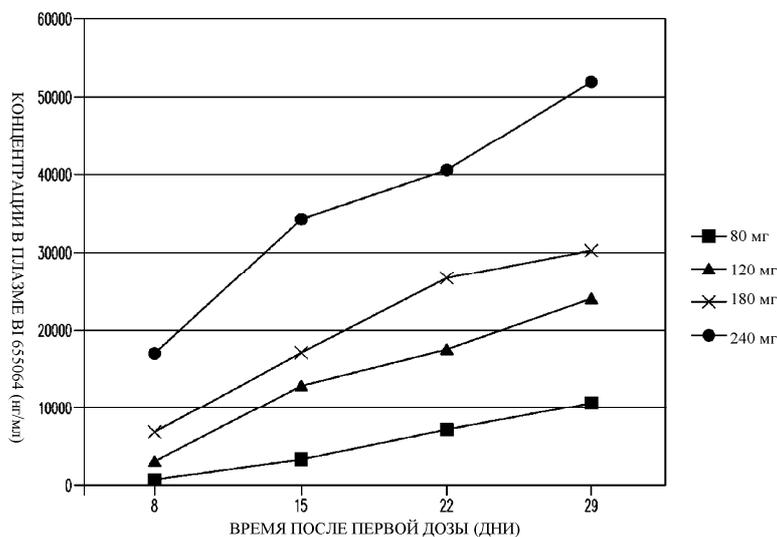
Применение решений, раскрытых в настоящем документе не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации будут находиться в пределах возможностей специалиста в данной области техники в свете решений, содержащихся в настоящем документе и сопровождающих примеров. Предполагают, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ лечения аутоиммунных заболеваний у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела к CD40, содержащего SEQ ID NO: 35 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 31 легкой цепи, в ударной дозе, которая составляет более 120 мг.



Фиг. 1



Фиг. 2

