

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048278**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.14
- (21) Номер заявки
202292118
- (22) Дата подачи заявки
2016.06.28
- (51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К CD40 С УСИЛЕННОЙ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

- (31) **62/304,012**
- (32) **2016.03.04**
- (33) **US**
- (43) **2023.02.28**
- (62) **201891925; 2016.06.28**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЭ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ
(US)**
- (72) Изобретатель:
Раветч Джеффри В., Дахан Рони (US)
- (74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В. (RU)**
- (56) **WO-A2-03040170
US-A1-20140221622
WO-A1-2015070972**

-
- (57) В изобретении предусмотрены агонистические антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с CD40 человека. Такие антитела необязательно содержат Fc-области с усиленной специфичностью в отношении FcγRIIb. Изобретение также относится к способам лечения рака или хронической инфекции путем введения антител согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

B1

048278

048278

B1

Ссылка на родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/304012, поданной 4 марта 2016 г., раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Недавние исследования показали, что раковые заболевания человека и хронические инфекции можно лечить с помощью средств, которые модулируют иммунный ответ пациента на злокачественные или инфицированные клетки. См., например, Reck & Paz-Ares (2015) *Semin. Oncol.* 42:402. Агонистические антитела к CD40, такие как CP-870893 и дацетузмаб (SGN-40), были опробованы для лечения рака на основании убеждения, что они могут усилить такой иммунный ответ. См., например, Kirkwood et al. (2012), *CA Cancer J. Clin.* 62:309; Vanderheide & Glennie (2013), *Clin. Cancer Res.* 19:1035. Недавние эксперименты на мышах выявили, что антитела к CD40 с усиленной специфичностью в отношении ингибирующего Fc-рецептора FcγRIIb характеризуются увеличенной противоопухолевой эффективностью. См., например, международную патентную публикацию WO 2012/087928; Smith, et al. (2012), *PNAS*, 109(16):6181-6; Li & Ravetch (2012), *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)*, 109:10966; Wilson et al. (2011), *Cancer Cell*, 19:101; White et al. (2011), *J. Immunol.* 187:1754.

Существует потребность в улучшенных агонистических антителах к CD40 человека для лечения рака и хронических инфекций у субъектов-людей. Такие антитела предпочтительно будут характеризоваться усиленной специфичностью в отношении ингибирующего Fc-рецептора FcγRIIb по сравнению с активирующими Fc-рецепторами и будут проявлять усиленную противоопухолевую и/или противоинфекционную активность.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела (например, мышинные моноклональные антитела, гуманизированные мышинные моноклональные антитела и моноклональные антитела человека), которые специфически связываются с CD40 человека (зрелая последовательность SEQ ID NO: 11), необязательно характеризующиеся модифицированными Fc-областями, которые усиливают специфичность в отношении связывания с рецептором FcγRIIb. Также предусмотрены (i) антитела, которые конкурируют с антителами, раскрытыми в настоящем документе, за связывание с CD40 человека, и (ii) антитела, которые связываются с теми же эпитопами, что и антитела, раскрытые в настоящем документе, т.е. антитела, которые конкурируют за связывание с CD40 человека с антителами, содержащими мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной или нескольким мутациям в тяжелой цепи IgG, выбранным группы, состоящей из N297A, S267E ("SE"), S267E/L382F ("SELF"), G237D/P238D/P271G/A330R ("V9") или G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V11") (SEQ ID NO: 3-7), такие как антитела, которые конкурируют за связывание с CD40 человека с mAb IgG1 клона 2141, которое также носит название CP-870,893.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и легкая цепь содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3 и Fc-варианты N297A, S267E ("SE"), S267E/L382F ("SELF"), G237D/P238D/P271G/A330R ("V9"), G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V11"), как раскрыто в табл. 2, приведенной в конце описания.

Согласно некоторым вариантам осуществления Fc-варианты включают в себя N297A (SEQ ID NO: 2, 3), SE (SEQ ID NO: 2, 4), SELF (SEQ ID NO: 2, 5), V9 (SEQ ID NO: 2, 6) и/или V11 (SEQ ID NO: 2, 7). Согласно альтернативным вариантам осуществления антитела к CD40 человека согласно настоящему изобретению включают в себя антитела, содержащие тяжелые и легкие цепи, состоящие по существу из последовательностей указанных тяжелых и легких цепей, или содержат тяжелые и легкие цепи, характеризующиеся по меньшей мере 80, 85, 90 и 95% идентичностью последовательностей по отношению к указанным последовательностям. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению содержат модифицированные Fc-области с большей специфичностью в отношении связывания с FcγRIIb в отличие от связывания с активирующими рецепторами, чем антитела с Fc-областями, встречающимися в природе. Согласно определенным вариантам осуществления соотношение A/I для антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению составляет меньше чем 5 и согласно предпочтительным вариантам осуществления меньше чем 1.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам к huCD40 или их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за связывание, перекрестно блокируют или связываются с тем же эпитопом, что и одно или несколько антител, содержащих Fc-варианты N297A (SEQ ID NO: 2, 3), SE (SEQ ID NO: 2, 4), SELF (SEQ ID NO: 2, 5), V9 (SEQ ID NO: 2, 6) и/или V11 (SEQ ID NO: 2, 7), включая в себя человеческие или гуманизированные антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к huCD40 согласно настоящему изобретению содержит одну или несколько тяжелых цепей и одну или несколько легких цепей, например две тяжелые цепи и две легкие цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая

часть, которые:

- (i) специфически связываются с CD40 человека и
- (ii) содержат мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной или несколькими мутациями в тяжелой цепи IgG, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-7.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть конкурируют за связывание с CD40 человека с CP-870,893 или ChiLob, 2141.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются усиленной специфичностью в отношении связывания с FcγRIIb.

Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим переменные области тяжелой и/или легкой цепей антител к CD40 согласно настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов, векторам экспрессии, содержащим молекулы нуклеиновой кислоты, клеткам, трансформированным векторами экспрессии, и способам получения антител путем экспрессии антител из клеток, трансформированных векторами экспрессии, и извлечения антитела.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к способу усиления иммунного ответа у субъекта, предусматривающему введение эффективного количества антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, субъекту так, чтобы усиливать иммунный ответ у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления субъект характеризуется наличием опухоли, и иммунный ответ против опухоли усиливается. Согласно другому варианту осуществления субъект характеризуется наличием вирусной инфекции, например хронической вирусной инфекции, и противовирусный иммунный ответ усиливается.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования роста опухолей у субъекта, предусматривающему введение субъекту антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента так, чтобы ингибировать рост опухоли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения рака, например, с помощью иммунотерапии, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в виде фармацевтической композиции, тем самым осуществляя лечение рака. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой следующее: рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легкого, рак желудка, герминогенный рак, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфома, лейкоз, миелома, саркома и рак вирусного происхождения. Согласно определенным вариантам осуществления рак представляет собой метастатический рак, рефрактерный рак или рецидивирующий рак.

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы модулирования иммунной функции и способы лечения предусматривают введение антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению в комбинации или в виде биспецифического реагента с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, вторым иммуномодулирующим антителом.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-D показаны характеристики гуманизированных в отношении CD40/FcγR мышей и Fc-вариантов клона 2141 к CD40:

A: представлено репрезентативное окрашивание с помощью проточной цитометрии CD40 мыши или человека на указанных популяциях спленоцитов от CD40^{-/-}huCD40^{+/+} мышей и мышей дикого типа.

B: представляет собой репрезентативное окрашивание с помощью проточной цитометрии GC B-клеток из мезентериального лимфоузла указанного типа мышей. Гейтировали живые B220⁺ клетки. GC B-клетки показаны как CD38-Fashi.

C: проиллюстрирован ELISA для обнаружения содержания в сыворотке специфического для H1N1 гриппа IgG от мышей, иммунизированных рекомбинантным H1N1 гриппа. Каждая точка представляет отдельную мышь.

D: проиллюстрирована специфичность связывания указанных Fc-вариантов Ab клона 2141 к CD40, оцененная с помощью ELISA с использованием рекомбинантного hCD40. Данные представлены как среднее. См. также табл. 1.

На фиг. 2 показано связывание hCD40 с CD40L мыши и человека с использованием анализа SPR с иммобилизованным CD40 человека и растворимым CD40L человека/мыши, титруемым от 33 до 0,5 нМ.

На фиг. 3A и B показано, что человека mAb к CD40 требуют взаимодействия с FcγR для *in vivo* ак-

тивности:

А: показан профиль связывания с FcγR Fc-вариантов клона 2141 к CD40. См. также табл. 2, приведенную в конце описания.

В: показан анализ проточной цитометрии в отношении OVA-специфических CD8⁺ Т-клеток в крови гуманизированных в отношении CD40/FcγR мышей, иммунизированных с помощью DEC-OVA в присутствии или при отсутствии указанных анти-CD40 Fc-вариантов CP-890,873 (слева) или ChiLob 7/4 (справа). Каждая точка представляет отдельную мышь.

На фиг. 4A-D показана увеличенная активность CP-870,893 с помощью Fc-инженерии для специфического в отношении FcγRIIB усиления:

А: показано кратность изменения аффинностей связывания hFcγRIIB и hFcγRIIB/hFcγRIIA^{R131} анти-CD40 Fc-вариантов 2141 на основании измерений с помощью SPR. См. также табл. 2, приведенную в конце описания.

В: показан анализ проточной цитометрии в отношении OVA-специфических CD8⁺ Т-клеток в крови huCD40/FcγR мышей, иммунизированных с помощью DEC-OVA в присутствии или при отсутствии указанных анти-CD40 Fc-вариантов CP-870,893. Каждая точка представляет отдельную мышь.

С: показаны количества тромбоцитов в крови через 24 ч после введения Fc-вариантов CP-870,893 к CD40 гуманизированным в отношении CD40/FcγR мышам. Каждая точка представляет отдельную мышь.

Д: показаны hCD40⁺/hFcγRIIA⁺/hFcγRIIB⁺ или hCD40⁺/hFcγRIIA⁷/hFcγRIIB⁺ мыши, которых иммунизировали с помощью DEC-OVA в присутствии CP-870,893-IgG2 и анализировали в отношении процентных отношений OVA-специфических CD8⁺ Т-клеток в крови на 7 день. См. также табл. 2, приведенную в конце описания.

На фиг. 5A и B показана увеличенная активность CP-870,893 с помощью Fc-инженерии для специфического в отношении FcγRIIB усиления:

А: показано изменение общей массы тела с течением времени после однократной инъекции Fc-варианта CP-870,893 гуманизированным в отношении FcγR/CD40 мышам. Данные представлены как среднее ± SEM. n=4.

В: показаны количества тромбоцитов в крови гуманизированных в отношении CD40/FcγR мышей через 7 дней после введения анти-CD40 Fc-вариантов CP-870,893. Каждая точка представляет отдельную мышь.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, в частности моноклональным антителам, например гуманизированным или человеческим моноклональным антителам, которые специфически связываются с CD40 человека ("huCD40") и характеризуются агонистической активностью. Предусмотрены последовательности для различных гуманизированных мышинных моноклональных антител к huCD40. Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела происходят из конкретных мышинных последовательностей зародышевой линии тяжелой и легкой цепей и/или содержат конкретные структурные признаки, такие как области CDR, содержащие конкретные аминокислотные последовательности.

Дополнительно в настоящем документе предусмотрены способы получения таких антител, иммуноконъюгатов и биспецифических молекул, содержащих такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтические композиции, составленные так, чтобы содержать антитела или фрагменты. Кроме того, в настоящем документе предусмотрены способы применения антител для усиления иммунного ответа, отдельно или в комбинации с другими иммуностимулирующими средствами (например, антителами) и/или противоопухолевыми или противоинфекционными видами терапии. Соответственно, описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно использовать в лечении в широком разнообразии терапевтических применений, включая в себя, например, ингибирование роста опухоли и лечение хронических вирусных инфекций.

Определения

Для того чтобы настоящее описание было более понятным, сначала даны определения определенных терминов. Дополнительные определения представлены во всем подробном раскрытии настоящего изобретения.

CD40 относится к "представителю 5 суперсемейства рецепторов TNF" (TNFRSF5). Если иное не указано или не ясно из контекста, ссылки на CD40 в настоящем документе относятся к CD40 человека ("huCD40") и антитела к CD40 относятся к антителам к CD40 человека. CD40 человека дополнительно описан в GENE ID NO: 958 и MIM (Mendelian Inheritance in Man): 109535. Последовательность CD40 человека (NP 001241.1), включая в себя 20 аминокислотную сигнальную последовательность, представлена в SEQ ID NO: 11.

CD40 взаимодействует с лигандом CD40 (CD40L), который также называется TNFSF5, gp39 и CD154. Если не указано иное или не ясно из контекста, ссылки на CD40L в настоящем документе относятся к CD40L человека ("huCD40L"). CD40L человека дополнительно описан в GENE ID NO: 959 и

МIM: 300386. Последовательность CD40L человека (NP 000065.1) представлена в SEQ ID NO: 12.

Если иное не указано или не ясно из контекста, используемый в настоящем документе термин "антитело" может включать в себя целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их отдельные цепи. Согласно одному варианту осуществления "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающий фрагмент. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (которая сокращенно в настоящем документе обозначена V_H) и константной области тяжелой цепи. В определенных встречающихся в природе антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . В определенных встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (которая сокращенно в настоящем документе обозначена V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L можно дополнительно разделить на области гипервариабельности, которые называются определяющие комплементарность области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех каркасных областей (FR), расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент ($C1q$) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфически связываются со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, которая отражается в константе диссоциации (K_D), составляющей 10^{-7} - 10^{-11} М или меньше. Любая K_D больше чем приблизительно 10^{-6} М, как правило, рассматривается как указывающая на неспецифическое связывание. Используемое в настоящем документе антитело, которое "связывается специфически" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и по существу идентичными антигенами с высокой аффинностью, это означает, что характеризуется K_D , составляющей 10^{-7} М или меньше, предпочтительно 10^{-8} М или меньше, даже более предпочтительно 5×10^{-9} М или меньше и наиболее предпочтительно 10^{-8} - 10^{-10} М или меньше, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по существу идентичным" данному антигену, если он проявляет высокую степень идентичности последовательностей по отношению к данному антигену, например, если он проявляет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97% или даже более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности последовательностей по отношению к последовательности данного антигена. В качестве примера антитело, которое специфически связывается с CD40 человека, также может давать перекрестную реакцию с CD40 из определенного вида не являющегося человеком примата (например, яванского макака), но может не давать перекрестную реакцию с CD40 из другого вида или с антигеном, отличным от CD40.

Если не указано иное, иммуноглобулин может принадлежать к любому из широко известных изоформ, включая в себя без ограничения IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG разделен на подклассы в определенных видах: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Иммуноглобулины, например IgG1 человека, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Если не указано иное, "антитело" может включать в себя, в качестве примера, моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и не относящиеся к человеку антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или нескольким фрагментами антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, CD40 человека). Примеры связывающих фрагментов, включенные в термин "антигенсвязывающая часть/фрагмент" антитела, включают в себя (i) Fab-фрагмент - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент - бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком на шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, и (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989), Nature, 341:544-546), состоящий из домена V_H . Выделенная определяющая комплементарность область (CDR) или комбинация двух или более выделенных CDR, соединенных синтетическим линкером, могут содержать антигенсвязывающий домен антитела, если они способны связывать антиген.

Конструкты одноцепочечных антител также включены в настоящее изобретение. Хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются различными генами, их можно соединить с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; и Huston et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 85:5879-5883). Предусмотрено, что такие одноцепочечные анти-

тела также включают термин "антигенсвязывающая часть/фрагмент" антитела. Указанные и другие потенциальные конструкторы описаны в Chan & Carter (2010), *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Указанные фрагменты антител получают с использованием общепринятых техник, известных специалистам в настоящей области техники, и фрагменты подвергают скринингу в отношении применимости таким же образом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие части/фрагменты можно получить с помощью техник рекомбинантной ДНК или с помощью ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Если не указано иное, слово "фрагмент", используемый со ссылкой на антитело, например, в пункте формулы изобретения, относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела так, что "антитело или фрагмент" имеют такое же значение, что и "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент".

"Биспецифическое" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, характеризующееся двумя различными парами тяжелых/легких цепей, что приводит к двум антигенсвязывающим сайтам со специфичностью в отношении различных антигенов. Биспецифические антитела можно получить с помощью различных способов, включая в себя слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann (1990), *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321; Kostelny et al. (1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа, или композиции антител, в которой все антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Как правило, такие моноклональные антитела будут происходить из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и будут размножаться без преднамеренного введения каких-либо изменений последовательности. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к моноклональному антителу, которое содержит переменные и необязательные константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту осуществления моноклональные антитела человека получают с помощью гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной от трансгенного или трансхромосомного не являющегося человеком животного (например, трансгенной мыши, характеризующейся геномом, содержащим трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи), с иммортализованной клеткой.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное антитело человека" включает в себя все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных способов, такие как (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулина человека, или полученной из него гибридомы, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной, чтобы экспрессировать антитело, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других способов, которые включают в себя сплайсинг последовательности гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, которые используют конкретные последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но которые включают в себя последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антитела. Как известно в настоящей области техники (см., например, Lonberg (2005), *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируются с образованием антитела, специфического в отношении чужеродного антигена. В дополнение к реаранжировке переменную область можно дополнительно модифицировать с помощью многочисленных одноаминокислотных замен (также называемых соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела к чужеродному антигену. Константная область будет изменяться в дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, реаранжированные и соматически мутированные последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легких цепей и тяжелых цепей иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не являться идентичными исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого будут являться по существу идентичными или сходными (т.е. характеризоваться по меньшей мере 80% идентичностью).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, характеризующемуся переменными областями, в которых как каркасные области, так и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Более того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Тем не менее не подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, происходящие

из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используют синонимично.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором несколько, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR не относящегося к человеку антитела, например мышиног антитела, замещены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. Согласно одному варианту осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR были замещены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR являются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми при условии, что они не отменяют способность антитела связываться с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную с таковой у исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области происходят из одного вида и константные области происходят из другого вида, например к антителу, в котором переменные области происходят из мышиног антитела, а константные области происходят из человеческого антитела. "Гибридное" антитело относится к антителу, характеризующемуся тяжелыми и легкими цепями различных типов, такими как мышинная (родительская) тяжелая цепь и гуманизированная легкая цепь, или наоборот.

Используемый в настоящем документе термин "изотип" относится к классу антител, например антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к встречающимся в природе вариантам в пределах специфической изотипной группы, причем эти варианты отличаются одной или несколькими аминокислотами. См., например, Jefferis et al. (2009), mAbs 1:1.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфическое в отношении антигена" используют в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит другие антитела, характеризующиеся различными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD40, по существу не содержит антитела, которые специфически связывают антигены, отличные от CD40). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом CD40, тем не менее, может характеризоваться перекрестной реактивностью с другими белками CD40 из другого вида.

"Эффекторные функции" являются результатом взаимодействия Fc-области антитела с определенными рецепторами Fc, включают в себя, но необязательно ограничиваются следующим: связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и отрицательная регуляция рецептора клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции, как правило, нуждаются в объединении Fc-области с антигенсвязывающим доменом (например, переменным доменом антитела).

"Рецептор Fc" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая в себя аллельные варианты и альтернативно, сплайсированные формы указанных рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIb, или эквивалентно FcγRIIB) рецептора. Различные свойства FcγR человека обобщенно представлены в табл. 1. Большинство врожденных эффекторных клеточных типов коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIb, тогда как клетки - натуральные киллеры (NK-клетки) селективно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не экспрессируют ингибирующий FcγRIIb у мышей и людей. IgG1 человека связывается с большинством рецепторов Fc человека и считается эквивалентным мышинному IgG2a в отношении типов активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

Таблица 1

Свойства Fc γ R человека				
Fc γ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении IgG человека	Изотипное предпочтение	Клеточное распределение
Fc γ RI	Не описаны	Высокая (K _D ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
Fc γ RIIA	H131	Низкая - средняя	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, макрофаги, дендритные тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	моноциты, эозинофилы, клетки,
Fc γ RIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	моноциты, тучные клетки,
Fc γ RIIb	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	В-клетки, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Fc-область" (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), или "Fc-домен", или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках), или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина (например, C_{H1} или C_L). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит константные домены C_{H2} и C_{H3} в каждой из двух тяжелых цепей антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C_{H2}-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG Fc-область содержит домены C γ 2 и C γ 3 иммуноглобулина и шарнир между C γ 1 и C γ 2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяется участком от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между указанными двумя аминокислотами) до карбоксиконца тяжелой цепи, причем нумерацию проводят согласно EU-индексу согласно Kabat. Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD; см. также фиг. 3c-3f в публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0248028. Домен C_{H2} Fc-области IgG человека продолжается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как домен C_{H3} расположен на C-концевой стороне домена C_{H2} в Fc-области, т.е. он продолжается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 IgG (включая в себя C-концевую лизин). Используемая в настоящем документе Fc-область может представлять собой нативную последовательность Fc, включая в себя любой аллотипический вариант или вариацию Fc (например, не встречающуюся в природе Fc). Fc также может относиться к этой области самой по себе или в контексте Fc-содержащего белкового полипептида, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также носящий название "Fc-слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Fc-область нативной последовательности" или "Fc нативной последовательности" содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Fc-области человека нативной последовательности включают в себя Fc-область нативной последовательности IgG1 человека; Fc-область нативной последовательности IgG2 человека; Fc-область нативной последовательности IgG3 человека и Fc-область нативной последовательности IgG4 человека, а также их встречающиеся в природе варианты. Fc нативной последовательности включает в себя различные аллотипы Fc. См., например, Jefferis et al. (2009), mAbs 1:1.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, huCD40), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в пределах белковых антигенов могут быть образованы из смежных аминокислот (как правило, линейный эпитоп) или несмежных аминокислот, пространственно сближенных в результате укладки белка в третичную структуру (как правило, конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии на них денатурирующих растворителей, тогда как, как правило, происходит потеря эпитопов, образованных укладкой в третичную структуру при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин "картирование эпитопов" относится к способу идентификации молекулярных детерминант на антигене, вовлеченных в распознавание антитело-антиген. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, анализы иммуноблоттинг и иммунопреципитация, причем перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из CD40) исследуют в отношении реактивности с данным антителом (например, антителом к CD40); рентгеновская кристаллография; двумерный ядерный магнитный резонанс; дрожжевой дисплей и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris,

Ed. (1996)).

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом" со ссылкой на два или более антитела означает, что антитела связываются с одинаковым сегментом аминокислотных остатков, как определено с помощью данного способа. Техники для определения того, связываются ли антитела с "одним и тем же эпитопом на CD40", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеновские анализы кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Другие способы обеспечивают мониторинг связывания антитела с антигенными фрагментами (например, протеолитическими фрагментами) или с мутированными вариациями антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем компонента эпитопа, такие как аланин-сканирующий мутагенез (Cunningham & Wells (1985), *Science*, 244:1081) или дрожжевой дисплей мутантных вариантов целевой последовательности. Кроме того, также можно использовать вычислительные комбинаторные способы картирования эпитопов. Указанные способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Антитела, характеризующиеся одинаковыми или очень похожими V_L и V_H или одинаковыми последовательностями CDR, как предполагают, связываются с одинаковым эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Независимо от того, конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. независимо от того, будет ли ингибировать и в какой степени одно антитело ингибирует связывание другого антитела с мишенью, можно определить с использованием известных конкурентных экспериментов. Согласно определенным вариантам осуществления антитело конкурирует за связывание и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может являться различным в зависимости от того, какое антитело представляет собой "блокирующее антитело" (т.е. холодное антитело, которое инкубируют первым с мишенью). Конкурентные анализы можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb. Protoc*; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 в "Using Antibodies" Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое препятствие).

Другие конкурентно-связывающие анализы включают в себя: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой ферментный иммуноанализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli et al. (1983), *Methods in Enzymology* 9:242); твердофазный прямой EIA с использованием биотина-авидина (см. Kirkland et al. (1986), *J. Immunol.* 137:3614); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см. Harlow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с мечением с использованием метки I-125 (см. Morel et al. (1988), *Mol. Immunol.* 25(1):7); твердофазный прямой EIA с использованием биотина-авидина (Cheung et al. (1990), *Virology* 176:546) и прямой RIA с мечением (Moldenhauer et al. (1990), *Scand. J. Immunol.* 32:77).

Используемые в настоящем документе термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается" относятся к антителу, связывающемуся с эпитопом на заданном антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно меньше чем 10^{-7} М, такой как приблизительно меньше чем 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже при определении с помощью, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе для проведения поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием заданного антигена, например рекомбинантного CD40 человека, в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или анализа Скэтчарда связывания антитела с положительными в отношении антигена клетками, и (ii) связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Соответственно, антитело, которое "специфически связывается с CD40 человека" относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клетками CD40 человека с K_D , составляющей 10^{-7} М или меньше, например, приблизительно меньше чем 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже. Антитело, которое "дает перекрестную реакцию с CD40 яванского макака", относится к антителу, которое связывается с CD40 яванского макака с K_D , составляющей 10^{-7} М или меньше, например, приблизительно меньше чем 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже.

Используемый в настоящем документе термин " $k_{ассоц}$ " или " K_A " относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как используемый в настоящем документе термин " $k_{дисс}$ " или " K_D " относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из соотношения K_D к K_A (т.е. K_D/K_A) и выражают как молярную кон-

центрацию (M). Значения K_D для антител можно определить с использованием способов, общепринятых в настоящей области техники. Предпочтительный способ определения K_D антитела представляет собой анализ биослойной интерферометрии (BLI), предпочтительно с использованием устройства ForteBio Octet RED, поверхностный плазмонный резонанс, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (см. пример 5), или проточную цитометрию и анализ Скэтчарда.

Термин "EC₅₀" в контексте *in vitro* или *in vivo* анализа с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая вызывает ответ, который составляет 50% от максимального ответа, т.е. находится посередине между максимальным ответом и исходным значением.

Термин "связывается с иммобилизованным CD40" относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с CD40, например, экспрессированным на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

Используемый в настоящем документе термин "дает перекрестную реакцию" относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с CD40 из другого вида. Например, описанное в настоящем документе антитело, которое связывается с CD40 человека, также может связываться с CD40 из другого вида (например, CD40 яванского макака). Используемую в настоящем документе перекрестную реактивность можно измерить путем обнаружения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA), или связывания, или иным образом функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими CD40. Способы определения перекрестной реактивности включают в себя стандартные анализы связывания, описанные в настоящем документе, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (SPR) с использованием прибора BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden) или техник проточной цитометрии.

Используемый в настоящем документе термин "встречающийся в природе" применительно к объекту относится к тому факту, что объект может встречаться в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая в себя вирусы), которую можно выделить из источника в природе и которая преднамеренно не была модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка, без верхнего предела по длине цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "молекула нуклеиновой кислоты" включает в себя молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может являться одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также предусмотрены "консервативные модификации последовательности" в последовательности антитела, предусмотренной в настоящем документе, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не отменяют связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Например, модификации можно ввести с помощью стандартных техник, известных в настоящей области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, характеризующимся сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, характеризующихся сходными боковыми цепями, были определены в настоящей области техники. Указанные семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, прогнозируемый несущественный аминокислотный остаток в антителе к CD40 предпочтительно замещен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в настоящей области техники. См., например, Brummell et al. (1993), *Biochem.* 32:1180-1187; Kobayashi et al. (1999), *Protein Eng.* 12(10):879-884; и Burks et al. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 94:412-417.

Альтернативно, согласно другому варианту осуществления мутации можно вводить случайным образом по всей или части кодирующей последовательности антитела к CD40, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела к CD40 можно подвергать скринингу в отношении улучшенной связывающей активности.

Для нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, как правило, по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% нуклеотидов. Альтернативно, существенная гомология существует, если сегменты будут гибридизоваться при условиях селективной гибридизации с комплементарной цепью.

Для полипептидов термин "существенная гомология" указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, с соответствующими аминокислотными вставками или делециями, по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, как правило, по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% аминокислот.

Идентичность в процентах между двумя последовательностями представляет собой функцию от числа идентичных положений, общих для последовательностей при оптимальном выравнивании последовательностей (т.е. % гомологии = число идентичных положений/общее число положений \times 100), с оптимальным выравниванием, определяемым с учетом числа разрывов и длины каждого разрыва, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение идентичности в процентах между двумя последовательностями можно осуществить с использованием математического алгоритма, описанного в неограничивающих примерах ниже.

Идентичность в процентах между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG с использованием NWSgardna. Матрица СМР и штраф за введение разрыва составляет 40, 50, 60, 70 или 80, и штраф за удлинение разрыва составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Идентичность в процентах между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за удлинение разрыва, составляющего 12, и штрафа за введение разрыва, составляющего 4. Кроме того, идентичность в процентах между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша, Needleman and Wunsch ((1970), J. Mol. Biol. (48):444-453), который встроен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG, с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 и штрафа за введение разрыва, составляющего 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за удлинение разрыва, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновых кислот и белковые последовательности можно дополнительно использовать в качестве "искомой последовательности" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации связанных с ней последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) от Altschul, et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов в BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, вес = 100, длина слова = 12 с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описанным в настоящем документе. Поиски белков в BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, вес = 50, длина слова = 3 с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков, описанным в настоящем документе. Для получения содержащих разрывы выравниваний для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "ставшей по существу чистой", будучи очищенной от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, с помощью стандартных техник, включая в себя обработку щелочью/SDS, бэндинг с помощью CsCl, колонную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в настоящей области техники. См., F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, характеризующиеся бактериальной точкой начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) можно интегрировать в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым репли-

цировать вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии"). В общем, векторы экспрессии, находящие применение в техниках рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. Согласно настоящему описанию изобретения термины "плазида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, так как плазида представляет собой наиболее часто используемую форму вектора. Тем не менее также предусмотрены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные в отношении репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Подразумевается, что используемый в настоящем документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая не присутствует естественным образом в клетке, и может представлять собой клетку, в которую ввели рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины, как подразумевается, относятся не только к конкретной клетке субъекта, но также к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным родительской клетке, но все еще включено в объем используемого в настоящем документе термина "клетка-хозяин".

"Иммунный ответ" относится к биологическому ответу в организме позвоночного против чужеродных агентов, причем этот ответ защищает организм от указанного агента и заболеваний, вызванных ими. Иммунный ответ опосредован действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки-натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, производимых любой из указанных клеток или печени (включая в себя антитела, цитокины и комплемент), которое приводит к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других патологических клеток или в случае аутоиммунной реакции или патологического воспаления нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает в себя, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетка, или ингибирование или истощение T_{reg}-клетки. "Т-эффекторные" ("T_{eff}") клетки относятся к Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитическими активностями, а также Т-хелперным (Th) клеткам, которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают в себя регуляторные Т-клетки (T_{reg}-клетки).

Используемый в настоящем документе термин "опосредованный Т-клетками ответ" относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая в себя эффекторные Т-клетки (например, CD8⁺ клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4⁺ клетки). Опосредованные Т-клетками ответы включают в себя, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Используемый в настоящем документе термин "ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы CTL опосредованы, главным образом, CD8⁺ Т-клетками.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту сигнального пути, который может быть вовлечен в модулирование, регуляцию или модификацию иммунного ответа. "Модулирование", "регуляция" или "модификация" иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или в активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, что может проявляться в увеличении или уменьшении числа различных типов клеток, увеличении или уменьшении активности указанных клеток или любых других изменениях, которые могут происходить в иммунной системе. Идентифицированы как ингибирующие и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут характеризоваться усиленной функцией в микроокружении опухоли. Согласно предпочтительным вариантам осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, который нацелен на связывание и чья активность изменяется за счет связывания вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодулирующие лиганды").

"Иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием или подверженного риску появления заболевания или страдающего от рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индукцию, усиление, подавление или иным образом модификацию иммунного ответа.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия" относится к терапии, которая приводит к увеличению (индукции или усилению) иммунного ответа у субъекта, например, для лечения рака.

"Потенцирующий эндогенный иммунный ответ" означает увеличивающий эффективность или результативность существующего иммунного ответа у субъекта. Это увеличение эффективности и резуль-

тативности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина или путем симуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Используемый в настоящем документе термин "связанные" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может являться ковалентной или нековалентной. Связь также может являться генетической (например, рекомбинантно слитые). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого разнообразия общепринятых техник, таких как химическое конъюгирование и получение рекомбинантных белков.

Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в настоящем документе, включают в себя следующее: внутривенный, интраперитонеальный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, с помощью инъекции, и включает в себя без ограничения следующее: внутривенная, интраперитонеальная, внутримышечная, внутриартериальная, интратекальная, внутримонокулярная, внутрилимфатическая, внутриочаговая, внутрикапсулярная, интраорбитальная, интракардиальная, интрадермальная, транстрахеальная, подкожная, внутримонокулярная, внутрисуставная, подкапсулярная, субарахноидальная, интраспинальная, эпидуральная и внутригрудная инъекция и инфузия, а также *in vivo* электропорация. Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный пути введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно проводить, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемые в настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" используют взаимозаменяемо, и они включают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование по меньшей мере приблизительно на 50%, например, по меньшей мере приблизительно на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%.

Используемый в настоящем документе термин "рак" относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое клеточное деление может привести к образованию раковых опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части организма через лимфатическую систему или кровоток.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому на субъекте, или введению активного средства субъекту с целью обратного развития, облегчения, уменьшения интенсивности, ингибирования или замедления или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, у которого отсутствует заболевание, для предотвращения возникновения заболевания или минимизации его эффектов, если оно возникает.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяют как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством стимулирует обратное развитие заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение ухудшения или инвалидности вследствие заболевания. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная дозировка" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или риску рецидива заболевания, ингибирует развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства стимулировать обратное развитие заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания можно оценить с использованием разнообразных способов, известных квалифицированному специалисту, например, у субъектов-людей во время клинических испытаний, в модельных системах с использованием животных, которые являются прогностическими в отношении эффективности у людей, или путем анализа активности средства в *in vitro* анализах.

В качестве примера противоопухолевое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование рака или стимулирует обратное развитие рака у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства стимулирует обратное развитие рака до момента устранения рака. "Стимулирование обратного развития рака" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством, приводит к снижению роста или размера опухоли, нек-

розу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, предотвращению ухудшения или инвалидности вследствие заболевания или снижению иным образом интенсивности симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства стимулировать обратное развитие рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемо низкому уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном, органном и/или организменном уровне (неблагоприятных эффектов), являющихся результатом введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует клеточный рост или рост опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно не получивших лечение субъектов. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибируют клеточный рост или рост опухоли, т.е. предпочтительно ингибируют клеточный рост или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить с использованием анализов, описанных ниже. Ингибирование роста опухоли может не происходить непосредственно после лечения и может происходить только через определенный период времени или после повторного введения. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить путем исследования способности соединения ингибировать клеточный рост, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных квалифицированному специалисту. Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, можно наблюдать обратное развитие опухоли, и оно может продолжаться в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 дней или даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 дней.

Подразумевается, что используемая в настоящем документе "комбинированная" терапия, если иное не ясно из контекста, предусматривает введение двух или более терапевтических средств скоординированным образом и включает в себя без ограничения одновременное введение доз. В частности, комбинированная терапия включает в себя совместное введение (например, введение совместного состава или одновременное введение отдельных терапевтических композиций) и серийное или последовательное введение при условии, что введение одного терапевтического средства каким-то образом обусловлено введением другого терапевтического средства. Например, одно терапевтическое средство можно вводить только после того, как введено другое терапевтическое средство и ему обеспечена возможность действовать в течение заданного периода времени. См., например, Kohrt et al. (2011), *Blood*. 117:2423.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку, который получает или профилактическое, или терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения субъекта, характеризующегося наличием рака.

Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны более подробно в следующих разделах.

I. Антитела к CD40.

Согласно настоящему изобретению раскрыты агонистические антитела к huCD40, характеризующиеся требуемыми свойствами для применения в качестве терапевтических средств в лечении таких заболеваний, как рак. Указанные свойства включают в себя одно или несколько из следующего: способность связываться с CD40 человека с высокой аффинностью, приемлемо низкая иммуногенность у субъектов-людей, способность связываться предпочтительно с FcγRIIb и отсутствие нежелательных особенностей в последовательности, которые могли бы снижать химическую стабильность антитела.

Антитела к CD40, раскрытые в настоящем документе с помощью последовательности, связываются со специфическими эпитопами на CD40 человека. Другие антитела, которые связываются с такими же или близкородственными эпитопами, вероятно, будут характеризоваться такими же указанными требуемыми свойствами, и их можно обнаружить, выполняя конкурентные эксперименты.

Антитела к huCD40, которые конкурируют с антителами к huCD40, раскрытыми в настоящем документе.

Антитела к huCD40, которые конкурируют с антителами согласно настоящему изобретению за связывание с huCD40, можно получить с использованием протоколов иммунизации, сходных с протоколами, описанными в настоящем документе (примеры 1 и 2). Антитела, которые конкурируют за связывание с антителами к huCD40, раскрытыми в настоящем документе с помощью последовательности, также можно создать с помощью иммунизации мышей или другого не являющегося человеком животного с помощью CD40 человека или конструкта, содержащего его внеклеточный домен (остатки 21-193 SEQ ID NO: 11), или путем иммунизации с помощью фрагмента CD40 человека, содержащего эпитоп, связанный антителами к huCD40, раскрытыми в настоящем документе. Полученные антитела можно подвергать скринингу в отношении способности блокировать связывание антитела, содержащего мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной

или несколькими мутациями в тяжелой цепи IgG, выбранным из группы, состоящей из N297A, SE, SELF, V9 и/или V11 (SEQ ID NO: 3-7), с CD40 человека с помощью способов, хорошо известных в настоящей области техники, например блокирование связывания с белком слияния внеклеточного домена CD40 и Fc-домена иммуноглобулина в ELISA или блокирование способности связываться с клетками, экспрессирующими huCD40 на своей поверхности, например, с помощью FACS. Согласно различным вариантам осуществления исследуемое антитело приводят в контакт с белком слияния CD40-Fc (или с клетками, экспрессирующими huCD40 на своей поверхности) перед, в то же время или после добавления антитела, содержащего мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной или несколькими мутациями в тяжелой цепи IgG, выбранным из группы, состоящей из N297A, SE, SELF, V9 и/или V11 (SEQ ID NO: 3-7). Например, эксперименты по "сортировке" можно проводить для определения того, попадает ли исследуемое антитело в ту же группу ("bin"), что и антитела, раскрытые в настоящем документе с помощью последовательности, с помощью антител, раскрытых в настоящем документе с помощью последовательности в качестве "эталонных" антител и антител, подлежащих исследованию, в качестве "исследуемых" антител. Антитела, которые снижают связывание антител, раскрытых в настоящем документе с помощью последовательности, с CD40 человека (либо в виде Fc-слияния, либо на клетке), в частности, примерно при стехиометрических концентрациях, вероятно, связываются с одними и теми же, перекрывающимися или соседними эпитопами и, таким образом, могут характеризоваться общими требуемыми функциональными свойствами антитела, содержащего мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной или несколькими мутациями в тяжелой цепи IgG, выбранным из группы, состоящей из N297A, SE, SELF, V9 и/или V11 (SEQ ID NO: 3-7).

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены антитела к huCD40, которые ингибируют связывание антител к huCD40, описанных в настоящем документе, с huCD40 на клетках по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% и/или чье связывание с huCD40 на клетках ингибируется антителами к huCD40, описанными в настоящем документе, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, например, что измерено с помощью ELISA или FACS, например с использованием анализа, описанного в следующем абзаце.

Иллюстративный конкурентный эксперимент для определения того, блокирует ли исследуемое антитело связывание эталонного антитела (т.е. "конкурирует с эталонным антителом"), можно провести следующим образом: клетки, экспрессирующие CD40, высевает с плотностью 10^5 клеток на лунку с образцом в 96-луночном планшете. Планшет помещают на лед с последующим добавлением неконъюгированного исследуемого антитела в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0 до 50 мкг/мл (3-кратное титрование, начиная с самой высокой концентрации, составляющей 50 мкг/мл). Неродственный IgG можно использовать в качестве изотипного контроля для первого антитела и его добавляют в тех же концентрациях (3-кратное титрование, начиная с самой высокой концентрации, составляющей 50 мкг/мл). Образец, предварительно инкубированный с 50 мкг/мл немеценным эталонным антителом, можно включать в качестве положительного контроля для завершения блокирования (100% ингибирования), и образец без антитела в первичной инкубации можно использовать в качестве отрицательного контроля (отсутствие конкуренции; 0% ингибирования). Через 30 мин инкубации меченое, например биотинилированное, эталонное антитело добавляют в концентрации, составляющей 2 мкг/мл на лунку без отмывки. Образцы инкубируют в течение еще 30 мин на льду. Несвязанные антитела удаляют путем отмывки клеток с помощью буфера для FACS. Связанное с клетками меченое эталонное антитело обнаруживают с помощью средства, которое обнаруживает метку, например конъюгированный с PE стрептавидин (Invitrogen, № по кат. S21388) для обнаружения биотина. Образцы получают на проточном цитометре FACS Calibur Flow Cytometer (BD, San Jose) и анализируют с помощью программного обеспечения Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Результаты можно представить в виде % ингибирования (т.е. вычитание из 100% количество метки при каждой концентрации, деленное на количество метки, полученное без блокирующего антитела).

Как правило, такой же эксперимент затем проводят наоборот, т.е. исследуемое антитело представляет собой эталонное антитело и эталонное антитело представляет собой исследуемое антитело. Согласно определенным вариантам осуществления антитело по меньшей мере частично (например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) или полностью (100%) блокирует связывание другого антитела с мишенью, например, CD40 человека или его фрагментом, и независимо от того, происходит ли ингибирование, когда одно или другое антитело является эталонным антителом. Эталонное антитело и исследуемое антитело "перекрестно блокируют" связывание друг друга с мишенью, когда антитела конкурируют друг с другом обоими путями, т.е. в конкурентных экспериментах, в которых сначала добавляют эталонное антитело, и в конкурентных экспериментах, в которых сначала добавляют исследуемое антитело.

Антитела к huCD40, которые связываются с одним тем же эпитопом.

Антитела к huCD40, которые связываются с теми же или сходными эпитопами, что и антитела, раскрытые в настоящем документе, можно получить с использованием протоколов иммунизации, сходных с

протоколами, описанными в настоящем документе. Полученные антитела можно подвергать скринингу в отношении высокоаффинного связывания с CD40 человека. Выбранные антитела затем можно исследовать в анализе дрожжевого дисплея, в котором варианты последовательностей huCD40 присутствуют на поверхности дрожжевых клеток, или с помощью экспериментов с водородно-дейтериевым обменом для определения точного эпитопа, связанного антителом.

Определения эпитопов можно осуществить с помощью любого способа, известного в настоящей области техники. Согласно различным вариантам осуществления считается, что антитела к huCD40 связываются с тем же эпитопом, что mAb к huCD40, раскрытое в настоящем документе, если они образуют контакт с одним или несколькими одинаковыми остатками в пределах по меньшей мере одной области huCD40; если они образуют контакты с большинством остатков в пределах по меньшей мере одной области huCD40; если они образуют контакты с большинством остатков в пределах каждой области huCD40; если они образуют контакт с большинством контактов по всей длине huCD40; если они образуют контакты в пределах всех одних и тех же различных областей CD40 человека; если они образуют контакт со всеми остатками на любой одной области на CD40 человека или если они образуют контакт со всеми одними и теми же остатками на всех одних и тех же областях. Эпитопные "области" представляют собой кластеры остатков в первичной последовательности.

Техники для определения антител, которые связываются с "одним и тем же эпитопом на huCD40", что и антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя рентгеновские анализы кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. Другие способы обеспечивают мониторинг связывания антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем компонента эпитопа. Способы также могут быть основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов (либо в нативной трехмерной форме, либо в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек на основе фагового дисплея или с помощью протеазной обработки целевого белка. Затем пептиды рассматриваются как лидеры для определения эпитопа, соответствующего антителу, используемому для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, отображают конформационные прерывистые эпитопы.

Эпитоп или область, содержащую эпитоп, также можно идентифицировать с помощью скрининга в отношении связывания с серией перекрывающихся пептидов, охватывающих CD40. Альтернативно, способ согласно Jespers et al. (1994), *Biotecnology*, 12:899 можно использовать для направления выбора антител, характеризующихся одинаковым эпитопом и, следовательно, свойствами, сходными с антителами к CD40, описанными в настоящем документе. С использованием фагового дисплея сначала тяжелую цепь антитела к CD40 спаривают с репертуаром (предпочтительно человеческих) легких цепей для выбора CD40-связывающего антитела и затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром (предпочтительно человеческих) тяжелых цепей для выбора (предпочтительно человеческого) связывающего CD40 антитела, характеризующегося тем же эпитопом или эпитопной областью, что и антитело к huCD40, описанное в настоящем документе. Альтернативные варианты антитела, описанного в настоящем документе, можно получить с помощью мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела.

Аланин-сканирующий мутагенез, описанный Cunningham & Wells (1989), *Science*, 244:1081, или какую-либо другую форму точечного мутагенеза аминокислотных остатков в CD40 (такую как способ дрожжевого дисплея, предусмотренный в примере 6) также можно использовать для определения функционального эпитопа для антитела к CD40.

Эпитоп или эпитопную область ("эпитопная область" представляет собой область, содержащую эпитоп или перекрывающуюся с эпитопом), связанные специфическим антителом, также можно определить с помощью оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты CD40. Серию перекрывающихся пептидов, включающих в себя последовательность CD40 (например, CD40 человека), можно синтезировать и подвергать скринингу в отношении связывания, например в прямом ELISA, конкурентном ELISA (где пептид оценивают в отношении его способности предотвращать связывание антитела к CD40, связанного с лункой титрационного микропланшета) или на чипе. Такие способы пептидного скрининга могут являться неспособными обнаружить некоторые прерывистые функциональные эпитопы, т.е. функциональные эпитопы, которые включают в себя аминокислотные остатки, которые не являются смежными в первичной последовательности полипептидной цепи CD40.

Эпитоп также можно идентифицировать с помощью основанного на MS белковом футпринтинге, таком как масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). HDX-MS можно провести, например, как дополнительно описано в Wei et al. (2014), *Drug Discovery Today*, 19:95, способы которой специально включены посредством ссылки в настоящий документ. FPOP можно провести, как описано, например, в Hambley & Gross (2005), *J. American Soc. Mass Spectrometry*, 16:2057, способы которой специально включены посредством ссылки в настоящий документ.

Эпитоп, связанный антителами к CD40, также можно определить с помощью структурных способов, таких как рентгеновское определение структуры кристаллов (например, WO 2005/044853), молеку-

лярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая в себя ЯМР определение скоростей обмена H-D атомов водорода неустойчивых амидов в CD40 в свободном состоянии и связанного в комплексе с представляющим интерес антителом (Zinn-Justin et al. (1992), *Biochemistry*, 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993), *Biochemistry*, 32:6884).

В отношении рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с использованием любого из способов, известных в настоящей области техники (например, Giege et al. (1994), *Acta Crystallogr.* D50:339; McPherson (1990), *Eur. J. Biochem.* 189:1), включая в себя микрообъем (например, Chayen (1997), *Structure*, 5:1269), диффузию из паровой фазы висячей капли (например, McPherson (1976), *J. Biol. Chem.* 251:6300), затравливание и диализ. Желательно использовать препарат белка, характеризующийся концентрацией, составляющей по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно приблизительно 10-20 мг/мл. Кристаллизация может быть наилучшим образом достигнута в растворе осадителя, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (PEG; средняя молекулярная масса в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да), предпочтительно приблизительно 5000-7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да, при этом концентрации находятся в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 30% (мас./об.). Кроме того, может быть желательно включить стабилизирующее белок средство, например глицерин, в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может являться желательной в растворе осадителя, предпочтительно в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мМ. Осадитель предпочтительно забуферивают до pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, применимые в растворе осадителя, могут варьировать и являются хорошо известными в настоящей области техники (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994), Springer-Verlag, New York). Примеры применимых буферов включают в себя без ограничения HEPES, Трис, MES и ацетат. Кристаллы можно выращивать в широком диапазоне температур, включая в себя 2, 4, 8 и 26°C.

Кристаллы антитело:антиген можно исследовать с использованием хорошо известных техник рентгеновской дифракции и можно уточнять с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемого Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell & Johnson (1985), *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикация заявки на выдачу патента США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993), *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997), *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000), *Acta Cryst.* D56:1313-1323), раскрытия которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Если не указано иное и со ссылкой на формулу изобретения, эпитоп, связанный антителом, представляет собой эпитоп, как определено с помощью способов HDX-MS.

Антитела к CD40, которые связываются с высокой аффинностью.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению связываются с huCD40 с высокой аффинностью, подобно антителам к huCD40, раскрытым в настоящем документе, увеличивая вероятность того, что они являются эффективными терапевтическими средствами. Согласно различным вариантам осуществления антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению связываются с huCD40 с K_D , составляющей меньше чем 10, 5, 2, 1 нМ, 300 или 100 пМ. Согласно другим вариантам осуществления антитела к huCD40 согласно настоящему изобретению связываются с huCD40 с K_D , составляющей 2 нМ - 100 пМ. Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител по отношению к huCD40 включают в себя анализы ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, биослойной интерферометрии (BLI) и анализ SPR BIACORE®.

Варианты последовательностей антитела к CD40.

Некоторая вариабельность в последовательностях антитела, раскрытых в настоящем документе, может являться допустимой и все еще сохранять требуемые свойства антитела. Границы областей CDR определяют с использованием системы Kabat (Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к антителам к huCD40, содержащим последовательности CDR, которые являются по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям CDR антител, раскрытых в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к антителам к huCD40, содержащим последовательности вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепей, которые являются по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными последовательностям вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепей антитела, содержащего мутантную Fc-область, характеризующуюся одной или несколькими мутациями, соответствующими одной или нескольким мутациям в тяжелой цепи IgG, выбранным из группы, состоящей из N297A, SE, SELF, V9 и/или V11 (SEQ ID NO: 3-7), и их гуманизированные производные).

Используемое в настоящем документе мышинное антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепей, которые "происходят из" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные области антител получают из системы, в которой используют гены иммуноглобулина зародышевой линии мыши, и последовательность антитела достаточно связана с зародышевой линией, что

она, более вероятно, происходит из данной зародышевой линии, чем из любой другой. Такие системы включают в себя иммунизацию мыши представляющим интерес антигеном. Последовательность(и) зародышевой линии иммуноглобулина мыши, из которой(ых) "происходит" последовательность, можно идентифицировать путем сравнения аминокислотной последовательности антитела с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии мыши и выбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии, которая является самой близкой последовательностью (т.е. наивысший % идентичности) в отношении последовательности антитела. Мышиное антитело, которое "происходит из" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии, может содержать различия аминокислот по сравнению с последовательностью зародышевой линии вследствие, например, встречающихся в природе соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Тем не менее выбранное мышиное антитело, как правило, является по меньшей мере на 90% идентичным в аминокислотной последовательности по отношению к аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, области V). В определенных случаях мышиное антитело может являться меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичным в аминокислотной последовательности относительно аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, области V). Как правило, антитело, которое происходит из конкретной последовательности зародышевой линии мыши, будет проявлять не больше чем 10 различий аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, области V). В определенных случаях мышиное антитело может содержать не больше чем 5 или даже не больше чем 4, 3, 2 или 1 различия аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, области V).

II. Сконструированные и модифицированные антитела.

Области V_H и V_L .

Кроме того, предусмотрены сконструированные и модифицированные антитела, которые можно получить с использованием антитела, характеризующегося одной или несколькими последовательностями V_H и/или V_L , раскрытыми в настоящем документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может характеризоваться измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. Антитело можно сконструировать путем модификации одного или нескольких остатков в пределах одной или обеих вариабельных областей (т.е. V_H и/или V_L), например в пределах одной или нескольких областей CDR и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело можно сконструировать путем модификации остатков в пределах константной(ых) области(ей), например, для изменения эффекторной(ых) функции(й) антитела.

Один тип инженерии вариабельной области, который можно проводить, представляет собой привитие CDR. Такое привитие является особенно применимым в гуманизации не относящихся к человеку антител к CD40, которые конкурируют за связывание с антителами к huCD40, раскрытыми в настоящем документе, и/или связываются с тем же эпитопом, что и антитела к huCD40, раскрытые в настоящем документе. Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелых и легких цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR являются более разнообразными между отдельными антителами, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитела с антигеном, существует возможность экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных эталонных антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые включают в себя последовательности CDR из конкретного эталонного антитела, привитые на каркасные последовательности из другого антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998), *Nature*, 332:323-327; Jones, P. et al. (1986), *Nature*, 321:522-525; Queen, C. et al. (1989), *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)*, 86:10029-10033; патент США № 5225539 на имя Winter, и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen et al.).

Такие каркасные последовательности можно получить из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают в себя последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельных областей тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase", а также в Kabat, E.A., et al. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NTH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992), "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops", *J. Mol. Biol.* 227:776-798; и Cox, J.P.L. et al. (1994), "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage", *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждой из которых явно включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительные каркасные последовательности для применения в антителах, описанных в настоящем документе, представляют собой такие, которые являются структурно сходными с каркасными

последовательностями, используемыми в антителах, описанных в настоящем документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно привить на каркасные области, которые характеризуются последовательностью, идентичной последовательности, встречающейся в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно привить на каркасные области, которые содержат вплоть до 20, предпочтительно консервативных, аминокислотных замен по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в определенных случаях предпочтительно мутировать остатки в пределах каркасных областей для поддержания или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen et al.).

Описанные в настоящем документе сконструированные антитела включают в себя те, в которых модификации произвели в каркасных остатках в пределах V_H и/или V_L , например, для улучшения свойств антитела. Часто такие каркасные модификации производят для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход состоит в том, чтобы "возвратно мутировать" один или несколько каркасных остатков до соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасной области до их конфигурации зародышевой линии, соматические мутации можно "возвратно мутировать" до последовательности зародышевой линии с помощью, например, сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Подразумевается, что также предусмотрены такие "возвратно мутированные" антитела.

Другой тип каркасной модификации предусматривает мутирование одного или нескольких остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одной или нескольких областей CDR для удаления Т-клеточных эпитопов, чтобы тем самым снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называется "деиммунизация" и описан более подробно в патентной публикации США № 20030153043, Carr et al.

Другой тип модификации переменных областей состоит в том, чтобы мутировать аминокислотные остатки в пределах областей CDR для улучшения одного или нескольких связывающих свойств (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез можно проводить для введения мутации(й) и воздействия на связывание антитела или другое функциональное свойство, представляющее интерес. Предпочтительно вводят консервативные модификации. Мутации могут представлять собой аминокислотные добавления, делеции или предпочтительно замены. Более того, как правило, изменяют не больше чем один, два, три, четыре или пять остатков в пределах области CDR.

Остатки метионина в CDR антител можно окислять, что приводит к потенциальному химическому разложению и последующему снижению активности антитела. Соответственно, также предусмотрены антитела к CD40, в которых один или несколько остатков метионина в CDR тяжелых и/или легких цепей замещены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительному разложению. Аналогично сайты деаминирования можно удалить из антител к CD40, в частности, в CDR. Потенциальные сайты гликозилирования в пределах антигенсвязывающего домена предпочтительно удаляют для предотвращения гликозилирования, которое может препятствовать связыванию с антигеном. См., например, патент США № 5714350.

Fc и модифицированные Fc.

Антитела согласно настоящему изобретению могут содержать переменные домены согласно настоящему изобретению, комбинированные с константными доменами, содержащими различные Fc-области, выбранные на основании биологических активностей (если таковые имеются) антитела для предусмотренного применения. Salfeld (2007), Nat. Biotechnol. 25:1369. IgG человека, например, можно классифицировать на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из указанных подклассов содержит Fc-область, характеризующуюся уникальным профилем для связывания с одним или несколькими рецепторами Fc γ (активирующие рецепторы Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA, Fc γ RIIC (CD32a,c); Fc γ RIIA и Fc γ RIIB (CD16a,b) и ингибирующий рецептор Fc γ RIIB (CD32b), и для первого компонента комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми рецепторами Fc γ ; IgG2 связывается с Fc γ RIIA131 и с пониженной аффинностью с Fc γ RIIA131 Fc γ RIIAV158; IgG4 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC и Fc γ RIIAV158; ингибирующий рецептор Fc γ RIIB характеризуется пониженной аффинностью в отношении IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие рецепторы Fc γ . Bruhns et al. (2009), Blood 113:3716. Исследования показали, что Fc γ RI не связывается с IgG2, и Fc γ RIIB не связывается с IgG2 или IgG4. В общем, в отношении активности ADCC IgG1 человека \geq IgG3 человека "IgG4 человека \geq IgG2 человека. Вследствие этого, например, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4 можно выбрать для применения в лекарственном средстве, где необходима ADCC; IgG3 можно выбрать при активации экспрессирующих Fc γ RIIA NK-клеток, моноцитов и макрофагов; и IgG4 можно выбрать, если антитело подлежит приме-

нению для десенситизации пациентов с аллергией. IgG4 также можно выбрать, если необходимо, чтобы у антитела отсутствовали все эффекторные функции.

Описанные в настоящем документе переменные области к huCD40 могут являться связанными (например, ковалентно связанными или слитыми) с Fc, например Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которая может принадлежать к любому аллотипу или изоаллотипу, например для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). См., например, Jefferis et al. (2009), mAbs 1:1). На выбор аллотипа могут влиять потенциальные проблемы иммуногенности, например, для минимизации образования антител к антибактериальным лекарственным средствам.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления антитела к CD40 согласно настоящему изобретению содержат Fc, которая связывается или характеризуется усиленным связыванием с FcγRIIb, что может обеспечивать усиленный агонизм. См., например, международную патентную публикацию WO 2012/087928; Li & Ravetch (2011), Science, 333:1030; Wilson et al. (2011), Cancer Cell, 19:101; White et al. (2011), J. Immunol. 187:1754. Описанные в настоящем документе переменные области могут являться связанными с Fc-вариантами, которые усиливают аффинность в отношении ингибирующего рецептора FcγRIIb, например для усиления индуцирующей апоптоз или адьювантной активности. Li & Ravetch (2012), Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), 109:10966; публикация заявки на выдачу патента США № 2014/0010812. Такие варианты могут обеспечивать антитело с иммуномодулирующими активностями, связанными с FcγRIIb⁺ клетками, включая в себя, например, В-клетки и моноциты. Согласно одному варианту осуществления Fc-варианты обеспечивают селективно усиленную аффинность к FcγRIIb по отношению к одному или нескольким активным рецепторам. Такие варианты также могут проявлять усиленное опосредованное FcR перекрестное связывание, приводящее к усиленной терапевтической эффективности. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают в себя одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332, согласно EU-индексу. Иллюстративные замены для усиления аффинности к FcγRIIb включают в себя без ограничения 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Иллюстративные замены включают в себя 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие Fc-варианты для усиления связывания с FcγRIIb включают в себя 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E и 267E-328F. В частности, варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включая в себя двойной вариант S267E-L328F, IgG1 человека, имеют особое значение для специфического усиления аффинности в отношении ингибирующего рецептора FcγRIIb. Chu et al. (2008), Mol. Immunol. 45:3926; публикация заявки на выдачу патента США № 2006/024298; WO 2012/087928. Усиленную специфичность в отношении FcγRIIb (в отличие от FcγRIIa^{R131}) можно получить путем добавления замены P238D и других мутаций (Mimoto et al. (2013), Protein. Eng. Des. & Selection, 26:589; WO 2012/1152410), а также V262E и V264E (Yu et al. (2013), J. Am. Chem. Soc. 135:9723 и WO 2014/184545. См. табл. 2, приведенную в конце описания.

Увеличение периода полужизни.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело является модифицированным для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, это можно осуществить путем увеличения аффинности связывания Fc-области в отношении FcRn. Согласно одному варианту осуществления антитело изменяют в пределах области C_H1 или CL, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена C_H2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5869046 и 6121022 на имя Presta et al. Другие иллюстративные Fc-варианты, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замены в положениях 259, 308 и 434, включая в себя, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают в себя 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al. (2004), J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. (2006), Journal of Immunology, 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 31 1A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al. (2001), Journal of Biological Chemistry, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. (2002), Journal of Immunology, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al. (2006), Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524). См. патент США № 8367805.

Модификацию определенных консервативных остатков в Fc IgG (I253, H310, Q311, H433, N434), такую как вариант N434A (Yeung et al. (2009), J. Immunol. 182:7663), предложили в качестве пути увеличения к аффинности FcRn, таким образом увеличивая период полужизни антитела в кровотоке. Международная патентная публикация WO 98/023289. Было показано, что комбинированный Fc-вариант, содержащий M428L и N434S, увеличивал связывание с FcRn и увеличивал период полужизни в сыворотке вплоть до пятикратного увеличения. Zalevsky et al. (2010), Nat. Biotechnol. 28:157. Комбинированный Fc-вариант, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также увеличивает период полужизни

антител IgG1. Petkova et al. (2006), *Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, было показано, что комбинированные Fc-варианты, содержащие варианты M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M и M428L-N434S, также увеличивают период полужизни. Международная патентная публикация WO 2009/086320.

Кроме того, комбинированный Fc-вариант, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полужизни почти в 4 раза. Dall'Acqua et al. (2006), *J. Biol. Chem.* 281:23514. Родственную модификацию IgG1, обеспечивающую увеличенную к аффинность FcRn, но сниженную зависимость от pH (M252Y-S254T-T256E-H433K-N434F), использовали для создания конструктора IgG1 ("MST-HN Abdeg") для применения в качестве конкурирующего средства для предотвращения связывания других антител с FcRn, что привело к увеличенному клиренсу этого другого антитела, или эндогенного IgG (например, в условиях аутоиммунного состояния), или другого экзогенного (терапевтического) mAb. Vassago et al. (2005), *Nat. Biotechnol.* 23:1283; международная патентная публикация WO 2006/130834.

Другие модификации для увеличения связывания с FcRn описаны в Yeung et al. (2010), *J. Immunol.* 182:7663-7671; патентах США № 6277375; 6821505; международных патентных публикациях WO 97/34631; WO 2002/060919.

Согласно определенным вариантам осуществления гибридные изотипы IgG можно использовать для увеличения связывания с FcRn и потенциально увеличения периода полужизни. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 можно сконструировать с помощью замены положений IgG1 в области C_H2 и/или C_H3 аминокислотами из IgG3 в положениях, в которых два изотипа различаются. Таким образом, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. Согласно другим вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 можно сконструировать путем замены положений IgG2 в области C_H2 и/или C_H3 аминокислотами из IgG1 в положениях, в которых два изотипа различаются. Таким образом, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например одну или несколько следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236) и 327A. См. патент США № 8629113. Создали гибрид последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, который предположительно увеличивает период полужизни в сыворотке и улучшает экспрессию. Патент США № 7867491 (последовательность № 18 в указанном документе).

Период полужизни антитела согласно настоящему изобретению в сыворотке также можно увеличить путем пегилирования. Антитело можно пегилировать, например, для увеличения биологического (например, сывороточного) периода полужизни антитела. Для пегилирования антитела антитело или его фрагмент, как правило, приводят в реакцию с полиэтиленгликольным (PEG) реагентом, таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное PEG, при условиях, в которых одна или несколько групп PEG прикреплены к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль", как подразумевается, включает в себя любую из форм PEG, которые использовали для дериватизации других белков, такие как моно-(C₁-C₁₀)алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. Согласно определенным вариантам осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой негликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в настоящей области техники, и их можно применять к антителам, описанным в настоящем документе. См., например, европейский патент № EP 0154316 на имя Nishimura et al., и EP 0401384 на имя Ishikawa et al.

Альтернативно, в определенных обстоятельствах может потребоваться уменьшить период полужизни антитела согласно настоящему изобретению, вместо его увеличения. Такие модификации, как I253A (Hornick et al. (2000), *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R, I253A или H310A (Kim et al. (2000), *Eur. J. Immunol.* 29:2819) в Fc IgG1 человека могут уменьшить связывание FcRn, таким образом уменьшая период полужизни (увеличивая клиренс) для применения в ситуациях, в которых быстрый клиренс является предпочтительным, например, в медицинской визуализации. См. также Kenanova et al. (2005), *Cancer Res.* 65:622. Другие средства для усиления клиренса включают в себя форматирование антигенсвязывающих доменов согласно настоящему изобретению в виде фрагментов антител, у которых отсутствует способность связывать FcRn, таких как Fab-фрагменты. Такая модификация может снизить период полужизни антитела в кровотоке от пары недель до нескольких часов. Селективное пегилирование фрагментов антител затем можно использовать до тонкого регулирования (увеличения) периода полужизни фрагментов антител при необходимости. Chapman et al. (1999), *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антител также можно подвергнуть слиянию с альбумином сыворотки человека, например, в конструкторе белка слияния, для увеличения периода полужизни. Yeh et al. (1992), *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)*, 89:1904. Альтернативно, можно сконструировать биспецифическое антитело с первым антигенсвязывающим доменом согласно настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с альбумином сыворотки человека (HSA). См. международную патентную публикацию WO 2009/127691 и ссылки на патенты, процитированные в ней. Альтернативно, специализированные полипептидные по-

следовательности можно добавить к фрагментам антител для увеличения периода полужизни, например, полипептидные последовательности "XTEN". Schellenberger et al. (2009), *Nat. Biotechnol.* 27:1186; международная патентная публикация WO 2010/091122.

Дополнительные Fc-варианты.

При использовании константного домена IgG4, как правило, предпочтительно, чтобы он включал в себя замену S228P, которая имитирует шарнирную последовательность в IgG1 и, тем самым, стабилизирует молекулы IgG4, например снижая обмен Fab-плечом между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, подлежащего лечению. Labrijn et al. (2009), *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000), *J. Immunol.* 164:1925.

Потенциальный сайт протеазного расщепления в шарнире конструкторов IgG1 можно устранить с помощью модификаций D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела, международная патентная публикация WO 2014/043344.

Аффинности и связывающие свойства Fc-варианта в отношении его лигандов (рецепторов Fc) можно определить с помощью разнообразных способов *in vitro* анализа (биохимические или иммунологические анализы), известных в настоящей области техники, включая в себя без ограничения равновесные способы (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммуноанализ (RIA)) или кинетические (например, анализ SPR BIACORE®) и другие способы, такие как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). В указанных и других способах можно использовать метку на одном или нескольких компонентах, подлежащих исследованию, и/или применять разнообразные способы обнаружения, включая в себя без ограничения хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетики можно найти в Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), которая сфокусирована на взаимодействиях антител с иммуногенами.

Согласно другим вариантам осуществления гликозилирование антитела модифицируют для увеличения или уменьшения эффекторной функции. Например, можно получить негликозилированное антитело, у которого полностью отсутствует эффекторная функция, путем мутирования консервативного остатка аспарагина в положении 297 (например, N297A), таким образом устраняя связывание комплемента и FcγRI. Bolt et al. (1993), *Eur. J. Immunol.* 23:403. См. также Tao & Morrison (1989), *J. Immunol.* 143:2595 (с использованием N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297).

Хотя у негликозилированных антител, как правило, отсутствует эффекторная функция, можно вводить мутации для восстановления этой функции. Негликозилированные антитела, например, те, которые получены за счет мутаций N297A/C/D/или H или произведены в системах (например, *E. coli*), которые не гликозилируют белки, можно дополнительно мутировать для восстановления связывания с FcγR, например, S298G и/или T299A/G/или H (WO 2009/079242) или E382V и M428I (Jung et al. (2010), *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)*, 107:604).

Гликоинженерию также можно использовать для модификации противовоспалительных свойств конструктора IgG путем изменения содержания α2,6-сиалила углеводных цепей, прикрепленных на Asn297 Fc-областей, причем увеличенная пропорция α2,6-сиалилированных форм приводит к усиленным противовоспалительным эффектам. См. Nimmerjahn et al. (2008), *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. Напротив, снижение пропорции антител, содержащих α2,6-сиалилированные углеводы, может являться применимым в случаях, когда противовоспалительные свойства не нужны. Способы модификации содержания α2,6-сиалилирования антител, например, путем селективной очистки α2,6-сиалилированных форм или путем ферментативной модификации предусмотрены в публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0206246. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотную последовательность Fc-области можно модифицировать для имитации эффекта α2,6-сиалилирования, например, путем введения модификации F241A, международная патентная публикация WO 2013/095966.

III. Физические свойства антител.

Описанные в настоящем документе антитела могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в варибельной области либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить в результате к увеличенной иммуногенности антитела или изменению pK антитела вследствие измененного связывания с антигеном (Marshall et al. (1972), *Ann. Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala and Morrison (2004), *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick et al. (1988), *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002), *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al., (1985), *Nature* 316:452-7; Mimura et al., (2000), *Mol. Immunol.* 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит на мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях предпочтительно, чтобы антитело к huCD40 не содержало гликозилирование варибельной области. Этого можно достичь либо путем выбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в варибельной области, либо путем мутирования остатков в пределах области гликозилирования.

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела не содержат сайты изомерии аспарагина. Деамидирование аспарагина может происходить на последова-

тельность N-G или D-G и может приводить к созданию остатка изоаспарагиновой кислоты, который вводит перегиб в полипептидную цепь и уменьшает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая, как правило, попадает в диапазон pH, составляющий 6-9,5. pI для антитела IgG1, как правило, находится в пределах диапазона pH, составляющего 7-9,5, и pI для антитела IgG4, как правило, попадает в пределы диапазона pH, составляющего 6-8. Существует предположение, что антитела с pI за пределами нормального диапазона могут характеризоваться некоторой степенью разворачивания и нестабильности при *in vivo* условиях. Таким образом, предпочтительно, чтобы антитело к CD40 характеризовалось значением pI, которое попадает в нормальный диапазон. Этого можно достичь либо с помощью выбора антител с pI в нормальном диапазоне, либо с помощью мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет характеризоваться характерной температурой плавления, при этом повышенная температура плавления указывает на большую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C. (2002), *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы Tm1 (температура исходного разворачивания) составляла больше чем 60°C, предпочтительно больше чем 65°C, даже более предпочтительно больше чем 70°C. Точку плавления антитела можно измерить с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003), *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999), *Immunol Lett.* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002), *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

Согласно предпочтительному варианту осуществления выбирают антитела, которые быстро не разлагаются. Разложение антитела можно измерить с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией) (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995), *Anal. Chem.* 67:3626-32).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления выбирают антитела, которые характеризуются минимальными агрегационными эффектами, которые могут привести к запуску нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, приемлемыми являются антитела с агрегацией, составляющей 25% или меньше, предпочтительно 20% или меньше, даже более предпочтительно 15% или меньше, даже более предпочтительно 10% или меньше и даже более предпочтительно 5% или меньше. Агрегацию можно измерить с помощью нескольких техник, включая в себя эксклюзионную колонку (SEC), высокочувствительную жидкостную хроматографию (HPLC) и рассеяние света.

IV. Молекулы нуклеиновой кислоты.

Другой описанный в настоящем документе аспект относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, описанные в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "ставшей по существу чистой", когда ее очищают от других клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, с помощью стандартных техник, включая в себя обработку щелочью/SDS, бэндинг с помощью CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в настоящей области техники. См., F. Ausubel, et al., ed. (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в настоящем документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. Согласно определенным вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты можно получить с использованием стандартных техник молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными из трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано дополнительно ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученного с помощью гибридомы, можно получить с помощью стандартных техник ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием техник фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно извлечь из библиотеки.

Получив фрагменты ДНК, кодирующие сегменты V_H и V_L, с указанными фрагментами ДНК можно проводить дополнительные манипуляции с помощью стандартных техник рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов переменных областей в гены полноразмерных цепей антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. В указанных манипуляциях кодирующий V_L или V_H фрагмент ДНК функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Подразумевается, что термин "функционально связанный", используемый в этом контексте, означает, что два фрагмента ДНК соединены так, чтобы аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, оставались в рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую область V_H, можно превратить в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей V_H ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей

константные области тяжелой цепи (шарнир, C_{H1} , C_{H2} и/или C_{H3}). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в настоящей области техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, включающие в себя указанные области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например область IgG1. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента кодирующая V_H ДНК может являться функционально связанной с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область C_{H1} тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую область V_L , можно превратить в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания кодирующей V_L ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, C_L . Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в настоящей области техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, включающие в себя указанные области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой каппа или лямбда константную область.

Для создания гена scFv кодирующие V_H и V_L ДНК фрагменты функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃, так, чтобы последовательности V_H и V_L можно было экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка, с областями V_L и V_H , соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988), Science, 242:423-426; Huston et al. (1988)Proc. Natl Acad. Sci. (USA), 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990), Nature, 348:552-554).

V. Создание антител.

Различные антитела согласно настоящему изобретению, например, те, которые конкурируют или связываются с тем же эпитопом, что антитела к CD40 человека, раскрытые в настоящем документе, можно получить с использованием разнообразных известных техник, таких как стандартная техника гибридизации соматических клеток, описанная Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе, также можно использовать другие техники для получения моноклональных антител, например вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, технику фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека.

Предпочтительная система с использованием животного для получения гибридом представляет собой систему с использованием мыши. Получение гибридом у мыши представляет собой очень хорошо налаженную процедуру. Протоколы иммунизации и техники для выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в настоящей области техники. Также известны партнеры по слиянию (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, можно получить на основании последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получить из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструировать так, чтобы она содержала не являющиеся мышинными (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина с использованием стандартных техник молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные вариабельные области можно связывать с константными областями человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 4816567 на имя Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные области CDR можно вставлять в каркасную область человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 5225539 на имя Winter и патенты США № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen et al.).

Согласно одному варианту осуществления антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против CD40 человека, можно создать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека вместо системы мыши. Указанные трансгенные и трансхромосомные мыши включают в себя мышей, которые в настоящем документе называются мышью HuMAb и мышью KM соответственно и обобщенно называются в настоящем документе "мышью с Ig человека".

HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) содержит мини-локусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют нереаранжированные последовательности тяжелых (μ и γ) и к легких цепей иммуноглобулина человека, вместе с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и к цепей (см., например, Lonberg, et al. (1994), Nature, 368(6474):856-859). Соответственно, мыши проявляют сниженную экспрессию IgM или к мыши, и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелых и легких цепей человека подвергаются переключению класса и соматической мутации для создания высокоаффинных моноклональных IgGк человека (Lonberg, N. et al. (1994), ранее; обзор в Lonberg, N. (1994),

Handbook of Experimental Pharmacology, 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995), Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995), Ann. NY. Acad. Sci. 764:536-546). Получение и применение мышей HuMab и геномные модификации, переносимые такими мышами, дополнительно описаны в Taylor, L. et al. (1992), Nucleic Acids Research, 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993), International Immunology, 5:647-656; Tuailleon et al. (1993), Proc. Natl Acad. Sci. (USA), 90:3720-3724; Choi et al. (1993), Nature Genetics, 4:117-123; Chen, J. et al. (1993), EMBO J. 12:821-830; Tuailleon et al. (1994), J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994), International Immunology, 6:579-591; и Fishwild, D. et al. (1996), Nature Biotechnology, 14:845-851, содержание всех из них полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. См. дополнительно патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все на имя Lonberg и Kay; патент США № 5545807 на имя Surani et al.; публикации согласно PCT № WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и публикация согласно PCT № WO 01/14424 на имя Korman et al.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела, описанные в настоящем документе, получают с использованием мыши, которая несет последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, которые в настоящем документе называются "мыши КМ", описаны подробно в публикации согласно PCT № WO 02/43478 на имя Ishida et al.

Кроме того, альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, доступны в настоящей области техники, и их можно использовать для получения антител к huCD40, описанных в настоящем документе. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, которая называется Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 на имя Kucherlapati et al.

Более того, альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулинов человека, доступны в настоящей области техники, и их можно использовать для получения антител к CD40, описанных в настоящем документе. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, которые называются "мыши ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 97:722-727. Более того, коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепей человека, были описаны в настоящей области техники (Kuroiwa et al. (2002), Nature Biotechnology, 20:889-894), и их можно использовать для получения антител к huCD40, описанных в настоящем документе.

Дополнительные мышинные системы, описанные в настоящей области техники для получения антител человека, например антител человека к huCD40, включают в себя (i) мышь VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), в которой эндогенные варибельные области тяжелых и легких цепей мыши были замещены посредством гомологичной рекомбинации, варибельными областями тяжелых и легких цепей человека, функционально связанными с эндогенными константными областями мыши так, чтобы у мышей производились химерные антитела (V человека/С мыши), и затем впоследствии их превращают в полностью человеческие антитела с использованием стандартных техник рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), в которой мышь содержит ререаранжированную варибельную область тяжелых цепей человека, но одну ререаранжированную общую варибельную область легкой цепи человека. Такие мыши и их применение для получения антител описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Моноклональные антитела человека, описанные в настоящем документе, также можно получить с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека являются общепринятыми в настоящей области техники. См., например, патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698 на имя Ladner et al.; патенты США № 5427908 и 5580717 на имя Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197 на имя McCafferty et al.; и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 на имя Griffiths et al.

Моноклональные антитела человека, описанные в настоящем документе, также можно получить с использованием мышей SCID, у которых иммунные клетки человека восстанавливают так, что ответ антител человека можно было получить при иммунизации. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767 на имя Wilson et al.

Иммунизации.

Для создания полностью человеческих антител к CD40 человека, мышей или трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены иммуноглобулинов человека (например, мышей HCo12, HCo7 или КМ), можно иммунизировать с помощью очищенного или обогащенного препарата антигена CD40 и/или клеток, экспрессирующих CD40, как описано для других антигенов, например, в Lonberg et al. (1994), Nature, 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996), Nature Biotechnology, 14:845-851 и международной патентной публикации WO 98/24884. Альтернативно, мышей можно иммунизировать с помощью

ДНК, кодирующей CD40 человека. Предпочтительно возраст мышей составляет 6-16 недель при первой инфузии. Например, очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена CD40 человека можно использовать для иммунизации мышей интраперитонеально. В случае, когда иммунизации с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена CD40 не привели в результате к образованию антител, мышей можно иммунизировать с помощью клеток, экспрессирующих CD40, например клеточной линии, для стимуляции иммунных ответов.

Накопленный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши HuMAb лучше отвечают, когда их изначально иммунизировали интраперитонеально (IP) или подкожно (SC) с помощью антигена в адьюванте Ribi, с последующими IP/SC иммунизациями через неделю (всего вплоть до 10) с помощью антигена в адьюванте Ribi.

Иммунный ответ можно подвергать мониторингу в течение всего протокола иммунизации, получая образцы плазмы с помощью ретроорбитальных кровопусканий. Плазму можно подвергать скринингу с помощью ELISA и FACS (как описано ниже), и мышей с достаточными титрами иммуноглобулина к CD40 человека можно использовать для слияний. Мышам можно вводить бустер-инъекцию внутривенно с помощью антигена за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Предполагают, что, возможно, потребуется выполнить 2-3 слияния для каждой иммунизации. От 6 до 24 мышей, как правило, иммунизируют для каждого антигена. Как правило, используют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, как HCo7, так и HCo12 трансген можно разводить вместе в одной мышши, характеризующейся двумя различными трансгенами тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Создание гибридом, производящих моноклональные антитела к CD40.

Для создания гибридом, производящих моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей, можно выделить и произвести их слияние с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия миеломы мыши. Полученные гибридомы можно подвергать скринингу в отношении продукции антигенспецифических антител. Например, одноклеточные суспензии лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей можно сливать с клетками несекреторной миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) с 50% PEG. Клетки помещают с плотностью, составляющей приблизительно 2×10^5 , в плоскодонный титрационный микропланшет с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей 10% фетальную сыворотку клона, 18% кондиционированную среду "653", 5% ориген (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50 ед./мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и $1 \times$ NAT (Sigma). Приблизительно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой NAT заменяют на HT. Отдельные лунки затем можно подвергать скринингу с помощью ELISA в отношении моноклональных антител IgM и IgG человека. Как только происходит масштабный рост гибридомы, можно проводить наблюдение за средой, как правило, через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы можно повторно помещать на планшет, снова подвергать скринингу, и, если они все еще являются положительными в отношении IgG человека, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды путем предельных разведений. Стабильные субклоны затем можно культивировать *in vitro* для создания небольших количеств антитела в среде культивирования тканей для определения характеристик.

Для очистки моноклональных антител выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых ролирных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать до аффинной хроматографии с помощью белок А-сефарозы (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить с помощью OD280 с использованием коэффициента экстинкции, составляющего 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C .

VI. Производство антител.

Создание трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к CD40.

Антитела согласно настоящему изобретению, включая в себя как конкретные антитела, для которых представлены последовательности, так и другие, родственные антитела к CD40, можно получить в трансфектоне клетки-хозяина с использованием, например, комбинации техник рекомбинантной ДНК и способов генной трансфекции, что хорошо известно в настоящей области техники (Morrison, S. (1985), Science, 229:1202).

Например, для экспрессии антител или их фрагментов антител ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, можно получить с помощью стандартных техник молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификация или клонирование кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес), и ДНК можно вставить в векторы экспрессии так, чтобы гены были функционально связаны с транскрипционными и трансляционными регуляторными последовательностями. В этом контексте подразумевается, что термин "функционально связанный" означает, что ген антитела лигирован в вектор так, чтобы транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в пределах вектора выполняли свою предусмотренную функцию регуляции

транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности регуляции экспрессии выбирают так, чтобы они являлись совместимыми с используемой клеткой-хозяином экспрессии. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно вставить в отдельный вектор или оба гена вставляют в один и тот же экспрессионный вектор. Гены антитела вставляют в экспрессионный(е) вектор(ы) с помощью стандартных способов (например, лигирование комплементарных рестрикционных сайтов на фрагменте гена антитела и вектора или лигирование тупых концов, если отсутствуют сайты рестрикции). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, описанных в настоящем документе, можно использовать для создания полноразмерных генов антитела любого изотипа антител путем вставки их в экспрессионные векторы, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи требуемого изотипа так, чтобы сегмент V_H являлся функционально связанным с сегментом(ами) C_H в пределах вектора, и сегмент V_L являлся функционально связанным с сегментом C_L в пределах вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который способствует секреции цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, чтобы сигнальный пептид был связан в одной рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из не являющегося иммуноглобулином белка).

В дополнение к генам цепей антитела рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Подразумевается, что термин "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие контролирующие экспрессию элементы (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в настоящей области техники понятно, что строение экспрессионного вектора, включая в себя выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии требуемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине млекопитающего включают в себя вирусные элементы, которые управляют высокими уровнями экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, аденовирусный главный поздний промотор (AdMLP) и полиомы. Альтернативно, можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или β -глобиновый промотор. Кроме того, можно использовать регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из различных источников, такие как промоторная система $SR\alpha$, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса Т-клеточного лейкоза типа 1 человека (Takebe, Y. et al. (1988), *Mol. Cell Biol.* 8:466-472).

В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген облегчает выбор клонок-хозяев, в которые вектор был введен (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все на имя Axel et al.). Например, как правило, селективируемый маркерный ген придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую введен вектор. Предпочтительные селективируемые маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген neo (для селекции в отношении G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей экспрессионный(е) вектор(ы), кодирующий(е) тяжелые и легкие цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных техник. Подразумевается, что различные формы термина "трансфекция" включают в себя широкое разнообразие техник, обычно используемых для введения эндогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорация, осаждение фосфатом кальция, трансфекция с использованием DEAE-декстарана и т.п. Хотя теоретически можно экспрессировать антитела, описанные в настоящем документе, или в прокариотических, или в эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно клетках-хозяевах млекопитающих является наиболее предпочтительной, поскольку такие эукариотические клетки и особенно клетки млекопитающих более вероятно, чем прокариотические клетки, осуществляют сборку и секретируют характеризующееся правильной укладкой и иммунологически активное антитело. Прокариотическая экспрессия генов антител, как сообщалось, является неэффективной для продукции высоких выходов активного антитела (Boss, M.A. and Wood, C.R. (1985), *Immunology Today*, 6:12-13). Антитела согласно настоящему изобретению также можно получить в полученных с помощью гликоинженерии штаммах дрожжей *Pichia pastoris*. Li et al. (2006), *Nat. Biotechnol.* 24:210.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описанных в настоящем документе, включают в себя клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая в себя dhfr-клетки CHO, описанные в Urlaub and Chasin, (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 77:4216-4220, используемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982), Mol. Biol. 759:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с клетками миеломы NSO другая предпочтительная экспрессионная система представляет собой система экспрессии генов GS, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно секреции антитела в среду культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно извлечь из среды культивирования с использованием стандартных способов очистки белка. N- и C-концы полипептидных цепей антитела согласно настоящему изобретению могут различаться от предполагаемой последовательности вследствие обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, C-концевые остатки лизина часто утрачиваются из тяжелых цепей антитела. Dick et al. (2008), Biotechnol. Bioeng. 100:1132. N-концевые остатки глутамин и в меньшей степени остатки глутамата часто превращаются в остатки пироглутамата как на легких, так и на тяжелых цепях терапевтических антител. Dick et al. (2007), Biotechnol. Bioeng. 97:544; Liu et al. (2011), J. Biol. Chem. 286:11211.

VII. Анализы.

Описанные в настоящем документе антитела можно исследовать в отношении связывания с CD40 с помощью, например, стандартного ELISA. Вкратце, титрационные микропланшеты покрывают очищенным CD40 в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS и затем блокируют с помощью 5% бычьего сывороточного альбумина в PBS. Разведения антитела (например, разведения плазмы от иммунизированных с помощью CD40 мышей) добавляют к каждой лунке и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты отмывают с помощью PBS/Tween и затем инкубируют со вторичным реагентом (например, для человеческих антител или антител, иным образом характеризующихся константной областью тяжелой цепью человека, козий Fc-специфический поликлональный реагент к IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 ч при 37°C. После отмывки планшеты проявляют с помощью субстрата ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем дополнительно подвергают скринингу с помощью проточной цитометрии в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей CD40 человека, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует CD40. Вкратце, связывание антител к CD40 оценивают с помощью инкубации экспрессирующих CD40 клеток CHO с антителом к CD40 при разведении 1:20. Клетки отмывают и связывание обнаруживают с помощью PE-меченого Ab к IgG человека. Проточные цитометрические анализы проводят с использованием проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Предпочтительно для слиятий будут использовать мышей, у которых развиваются самые высокие титры. Аналогичные эксперименты можно проводить с использованием детекционных антител к антителам мыши, если необходимо обнаружить мышиные антитела к huCD40.

Анализ ELISA, как описано выше, можно использовать для скрининга в отношении антител и, таким образом, гибридом, которые производят антитела, которые показывают положительную реакционную способность в отношении иммуногена CD40. Гибридомы, которые производят антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с CD40, затем можно субклонировать и дополнительно определять характеристики. Один клон из каждой гибридомы, который сохраняет реакционную способность исходных клеток (согласно ELISA), затем можно выбрать для получения клеточного банка и для очистки антител.

Для очистки антител к CD40 выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых роллерных колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с помощью белка А-сефарозы (Pharmacia, Piscataway, NJ). Элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить с помощью OD280 с использованием коэффициента экстинкции, составляющего 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Для определения того, связываются ли выбранные моноклональные антитела к CD40 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированных MAb можно обнаружить с помощью меченного стрептавидином зонда. Конкурентные исследования с использованием немеченных моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно проводить с использованием покрытых CD40 планшетов для ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител анализы ELISA для определения изотипа можно проводить с использованием реагентов, специфических в отношении антител конкретного изотипа. Например, для определения изотипа моноклонального антитела человека лунки титрационных микропланшетов можно покрывать 1 мкг/мл антитела к иммуноглобулину человека в течение ночи при 4°C. После

блокирования с помощью 1% BSA планшеты приводят в реакцию с 1 мкг/мл или меньше исследуемых моноклональных антител или очищенных изотопных контролей при окружающей температуре в течение 1-2 ч. Лунки затем можно приводить в реакцию со специфическими либо к IgG1 человека, либо к IgM человека конъюгированными со щелочной фосфатазой зондами. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими CD40, можно использовать проточную цитометрию. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный CD40 (выращенные при стандартных условиях роста) смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После отмывки клетки приводят в реакцию с меченым фикоэритрином (PE) антителом к IgG при тех же условиях, что и окрашивание первичного антитела. Образцы можно анализировать с помощью прибора FAC-Scan с использованием свойств светового и бокового рассеяния для гейтирования отдельных клеток и определяют связывание меченых антител. Альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии можно использовать в дополнение или вместо анализа проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может иметь сниженную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

Антитела к huCD40 можно дополнительно исследовать в отношении реакционной способности по отношению к антигену CD40 с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих CD40, можно получать и подвергать электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены будут переносить на нитроцеллюлозные мембраны, блокировать с помощью 20% мышиной сыворотки и зондировать с помощью моноклональных антител, подлежащих исследованию. Связывание IgG можно обнаружить с использованием щелочной фосфатазы к IgG и проявить с помощью таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к CD40 включают в себя стандартные анализы, известные в настоящей области техники, например анализ биослойной интерферометрии (BLI) и анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием прибора для SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

Согласно одному варианту осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью CD40 человека. Антитело может специфически связываться с конкретным доменом (например, функциональным доменом) в пределах внеклеточного домена CD40. Согласно определенным вариантам осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью CD40 человека и внеклеточной областью CD40 яванского макака. Предпочтительно антитело связывается с CD40 человека с высокой аффинностью.

VIII. Биспецифические молекулы.

Описанные в настоящем документе антитела можно использовать для образования биспецифических молекул. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающие фрагменты могут являться дериватизированными или связанными с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) для создания биспецифической молекулы, которые связываются по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или целевыми молекулами. Описанное в настоящем документе антитело может фактически являться дериватизированным или связанным больше чем с одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые связываются больше чем с двумя различными сайтами связывания и/или целевыми молекулами; такие мультиспецифические молекулы также, как подразумевается, включены в используемый в настоящем документе термин "биспецифическая молекула". Для создания биспецифической молекулы, описанной в настоящем документе, описанное в настоящем документе антитело можно функционально связывать (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, так, чтобы в результате образовывалась биспецифическая молекула.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую связывающую специфичность в отношении CD40 и вторую связывающую специфичность в отношении второго целевого эпитопа. Согласно варианту осуществления, описанному в настоящем документе, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно включать в себя третью связывающую специфичность.

Согласно одному варианту осуществления биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе, содержат в качестве связывающей специфичности по меньшей мере одно антитело или его фрагмент антитела, включая в себя, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой их минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструктор, как описано в Ladner et al. патент США № 4946778, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Наряду с тем, что моноклональные антитела человека являются предпочтительными, другие антитела, которые можно использовать в биспецифических молекулах, описанных в настоящем документе, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Описанные в настоящем документе биспецифические молекулы можно получить путем конъюгирования составляющих связывающих специфичностей с использованием способов, известных в настоящей области техники. Например, каждую связывающую специфичность биспецифической молекулы можно получить отдельно и затем конъюгировать друг с другом. Если связывающие специфичности представляют собой белки или пептиды, разнообразными связывающими или перекрестно сшивающими средствами можно использовать для ковалентного конъюгирования. Примеры перекрестно сшивающих средств включают в себя следующее: белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984), J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M.A. et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:8648). Другие способы включают в себя те, которые описаны в Paulus (1985), Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985), Science, 229:81-83) и Glennie et al. (1987), J. Immunol. 139:2367-2375). Предпочтительные конъюгирующие средства представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба из которых доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если связывающие специфичности представляют собой антитела, их можно конъюгировать с помощью соединения через сульфгидрильную связь C-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления шарнирную область модифицируют, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один, перед конъюгированием.

Альтернативно, обе связывающие специфичности могут кодироваться в одном и том же векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ является особенно применимым, если биспецифическая молекула представляет собой белок слияния mAb × mAb, mAb × Fab, Fab × F(ab')₂ или лиганд × Fab. Описанная в настоящем документе биспецифическая молекула может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патента США № 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтвердить с использованием принятых в настоящей области техники способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), анализ FACS, биоанализ (например, ингибирование роста) или анализ вестерн-блоттинг. Каждый из указанных анализов, как правило, обнаруживает присутствие комплексов белок-антитело, представляющих конкретный интерес, с помощью использования меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса.

IX. Композиции.

Дополнительно предусмотрены композиции, например фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител к CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно или комбинацию (например, двух или более различных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул, описанных в настоящем документе. Например, описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул), которые связываются с различными эпитопами на целевом антигене или которые характеризуются взаимодополняющими активностями.

Согласно определенным вариантам осуществления композиция содержит антитело к CD40 в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 мг/мл или находящейся в диапазоне 1-300 или 100-300 мг/мл.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также можно вводить в комбинированной терапии, т.е. комбинированно с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать в себя описанное в настоящем документе антитело к CD40, комбинированное по меньшей мере с одним другим противоопухолевым и/или стимулирующим T-клетки (например, активирующим) средством. Примеры терапевтических средств, которые можно использовать в комбинированной терапии, описаны более подробно ниже в разделе, относящемся к применениям антител, описанных в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе терапевтические композиции могут включать в себя другие соединения, лекарственные средства и/или средства, используемые для лечения рака. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в

себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ к данному раку.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любое и все из следующего: растворители, дисперсионные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, с помощью инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, можно покрыть материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Описанные в настоящем документе фармацевтические соединения могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977), J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислоты включают в себя те, которые получены из нетоксических неорганических кислот, таких как соляная, азотная, ортофосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксических органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя те, которые получены из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксических органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя следующее: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропиленгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металлохелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, ортофосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают в себя следующее: вода, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем применения таких материалов оболочки, как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Указанные композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов можно достичь как с помощью процедур стерилизации, ранее, и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Кроме того, может быть предпочтительным включить в композиции изотонические средства, например сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированную абсорбцию инъекционной фармацевтической формы можно обеспечить путем включения в композицию средств, которые замедляют абсорбцию, например моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных растворов для немедленного применения для инъекций или дисперсии. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных средств известно в настоящей области техники. За исключением случаев, когда какая-либо общепринятая среда или средство являются несовместимым с активным соединением, предусмотрено их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению. Дополнительные активные соединения также включены в композиции.

Терапевтические композиции, как правило, должны являться стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем применения такой оболочки, как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтитель-

ным включить в композицию изотонические средства, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию средства, которое замедляет абсорбцию, например моностеаратные соли и желатин.

Стерильные инъекционные растворы можно получить путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения активного соединения в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), которые дают в результате порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно подвергнутого стерилизационной фильтрации раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя с получением отдельной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя с получением отдельной лекарственной формы будет, как правило, представлять собой такое количество композиции, которое производит терапевтический эффект. Как правило, из 100% это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы введения дозировок регулируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократный болюс, несколько разделенных доз можно вводить в течение определенного времени или дозу можно пропорционально снизить или увеличить в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Используемая в настоящем документе единичная лекарственная форма относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы производить требуемый терапевтический эффект, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Технические характеристики описанных в настоящем документе единичных лекарственных форм продиктованы и напрямую зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который необходимо достичь, и (б) ограничений, присущих области техники получения составов такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела дозировки находятся в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более типично 0,01-5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или могут находиться в пределах диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев.

В некоторых способах одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания, и в этом случае дозировка каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Терапевтическое антитело, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозировками могут составлять, например, каждую неделю, каждый месяц, каждые три месяца или каждый год. Интервалы также могут быть нерегулярными, что показано путем измерения уровня антител к целевому антигену у пациента. В некоторых способах дозировку регулируют для достижения концентрации антитела в плазме, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. В общем, антитела человека показывают самый длительный период полужизни, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и не относящиеся к человеку антитела. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно низкую дозировку вводят с относительно нечастыми интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами, пока не снизится или не прекратится прогрессирование заболевания, и предпочтительно, пока пациент не продемонстрирует частичное или полное уменьшение интенсивности симптомов заболевания. Следовательно, пациенту необязательно можно вводить профилактическую схему, хотя во многих показаниях иммунной онколо-

гии дальнейшее лечение не требуется.

Фактические уровни дозировок активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, можно изменять так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от разнообразных фармакокинетических факторов, включая в себя активность конкретных используемых композиций, описанных в настоящем документе, или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого активного соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую медицинскую историю пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в медицинской области техники.

"Терапевтически эффективная дозировка" антитела к CD40, описанного в настоящем документе, предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидности вследствие заболевания. В контексте рака терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дополнительное ухудшение физических симптомов, ассоциированных с раком. Симптомы рака хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, следующее: необычные признаки невусов, изменение внешнего вида невуса, включая в себя следующее: асимметрия, граница, цвет и/или диаметр, область недавно пигментированной кожи, аномальный невус, затемненная область под ногтем, уплотнения в молочной железе, изменения сосков, кисты молочной железы, боль в молочной железе, смерть, потеря веса, слабость, чрезмерная усталость, затрудненное питание, потеря аппетита, хронический кашель, прогрессирующая одышка, кровохаркание, кровь в моче, кровь в кале, тошнота, рвота, метастазы в печени, метастазы в легких, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, метеоризм, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорация толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвота с кровью, тяжелая потливость, лихорадка, высокое кровяное давление, анемия, диарея, желтуха, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстой кишке, метастазы в легких, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в кости, метастазы в почках и метастазы в поджелудочной железе, затруднение глотания и т.п. Терапевтическую эффективность можно наблюдать сразу же после первого введения агонистического mAb к huCD40 согласно настоящему изобретению или ее можно наблюдать через определенный период времени и/или после введения серии доз. Такая отсроченная эффективность наблюдается только после нескольких месяцев лечения, вплоть до 6, 9 или 12 месяцев. Крайне важно не допустить преждевременного решения, что агонистическое mAb к huCD40 согласно настоящему изобретению не обладает терапевтической эффективностью ввиду отсроченной эффективности, проявляемой некоторыми иммуноонкологическими средствами.

Терапевтически эффективная доза может предотвращать или задерживать возникновение рака, например, может потребоваться, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные анализы, используемые в диагностике рака, включают в себя анализы химических соединений (включая в себя измерение содержания растворимого CD40 или CD40L) (Hock et al. (2006), Cancer, 106:2148; Chung & Lim (2014), J. Trans. Med. 12:102), гематологию, серологию и радиологию. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который осуществляет мониторинг любого из вышеизложенного, можно использовать для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака. Специалист в настоящей области может определить такие количества на основе таких факторов, как размеры субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и конкретная композиция или выбранный путь введения.

Описанную в настоящем документе композицию можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из разнообразных способов, известных в настоящей области техники. Как понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будут варьировать в зависимости от требуемых результатов. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способ введения, отличный от энтерального и местного введения, как правило, с помощью инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, трансрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно получить вместе с носителями, которые будут защищать соединения от быстрого высвобождения, такие как состав контролируемого высвобождения, включая в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или, как правило, известны специалистам в настоящей области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в настоящей области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления описанную в настоящем документе терапевтическую композицию можно вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для применения с антителами к huCD40, описанными в настоящем документе, включают в себя следующее: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для подачи лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственного средства через кожу; патент США № 4447233, патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для лекарственного средства для доставки лекарственных средств в точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыта имплантируемая инфузионная система с регулятором расхода для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств, характеризующаяся многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственных средств. Указанные патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно составить для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения проникновения описанных в настоящем документе терапевтических соединений через BBB (при необходимости) их можно составить, например, в липосомах. В отношении способов производства липосом, см., например, патенты США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы и, таким образом, усиливают нацеленную доставку лекарственных средств (см., например, V.V. Ranade (1989), *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 на имя Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995), *FEBS Lett.* 357:140; M. Owaes et al. (1995), *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995), *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994), *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994), *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994; *Immunomethods*, 4:273.

Х. Применения и способы.

Описанные в настоящем документе антитела, композиции антител и способы характеризуются многочисленными *in vitro* и *in vivo* применимостями, включая в себя, например, усиление иммунного ответа путем агонизма передачи сигналов CD40. Согласно предпочтительному варианту осуществления описанные в настоящем документе антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. Например, описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно вводить в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при различных заболеваниях. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента так, чтобы иммунный ответ у субъекта усиливался, стимулировался или положительно регулировался.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, которые нуждаются в усилении иммунного ответа. Способы являются особенно подходящими для лечения пациентов-людей, характеризующихся наличием нарушения, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа). Согласно конкретному варианту осуществления способы являются особенно подходящими для лечения рака *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном или антиген может уже присутствовать в организме субъекта, подлежащего лечению (например, несущего опухоль или вирус субъекта). Если антитела к CD40 вводят вместе с другим средством, их можно вводить отдельно или одновременно.

Также предусмотрены способы обнаружения присутствия антигена CD40 человека в образце или измерения количества антигена CD40 человека, предусматривающие приведение в контакт образца и

контрольного образца с моноклональным антителом человека или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с CD40 человека, при условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его фрагментом и CD40 человека. Образование комплекса затем обнаруживают, причем разное образование комплекса в сравнении между образцом и контрольным образцом указывает на присутствие антигена CD40 человека в образце. Более того, описанные в настоящем документе антитела к CD40 можно использовать для очистки CD40 человека посредством иммуноаффинной очистки.

Учитывая способность описанных в настоящем документе антител к huCD40 усиливать костимуляцию Т-клеточных ответов, например антигенспецифических Т-клеточных ответов, в настоящем документе предусмотрены *in vitro* и *in vivo* способы применения описанных в настоящем документе антител, чтобы стимулировать, усиливать или положительно регулировать антигенспецифические Т-клеточные ответы, например противоопухолевые Т-клеточные ответы.

Ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток можно усиливать с использованием антител к CD40. Т-клетки могут представлять собой T_{eff}-клетки, например CD4⁺ T_{eff}-клетки, CD8⁺ T_{eff}-клетки, хелперные (Th) Т-клетки и цитотоксические (Tc) Т-клетки.

Дополнительно предусмотрены способы усиления иммунного ответа (например, антигенспецифического Т-клеточного ответа) у субъекта, предусматривающие введение описанного в настоящем документе антитела к huCD40 субъекту так, чтобы усиливать иммунный ответ (например, антигенспецифический Т-клеточный ответ) у субъекта. Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой субъекта с опухолью, и иммунный ответ против опухоли усиливается. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или опухоль жидких тканей, например, гематологической рак. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль является неиммуногенной. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль является PD-L1-положительной. Согласно определенным вариантам осуществления опухоль является PD-L1-отрицательной. Субъект также может представлять собой субъекта-вирусоносителя, и иммунный ответ против вируса усиливается.

Дополнительно предусмотрены способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к huCD40 так, чтобы ингибировать рост опухоли у субъекта. Также предусмотрены способы лечения хронической вирусной инфекции у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к huCD40 так, чтобы лечить хроническую вирусную инфекцию у субъекта.

Согласно определенным вариантам осуществления антитело к huCD40 вводят субъекту в виде смежной терапии. Лечение субъектов с раком с помощью антитела к huCD40 может приводить к долговременному пролонгированному ответу по сравнению с современным стандартом лечения; длительной выживаемости, составляющей по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или больше лет, выживаемости без рецидивов, составляющей по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или больше лет. Согласно определенным вариантам осуществления лечение субъекта с раком с помощью антитела к huCD40 предотвращает рецидив рака или задерживает появление рецидива рака, например, на 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или больше лет. Анти-CD40 лечение можно использовать в качестве первой или второй линии лечения.

Указанные и другие способы, описанные в настоящем документе, раскрыты более подробно ниже.

Рак.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения субъекта с раком, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к huCD40 так, чтобы осуществлять лечение субъекта, например, так, чтобы ингибировать или снижать рост злокачественных опухолей и/или чтобы опухоли регрессировали. Антитело к huCD40 можно использовать отдельно для ингибирования роста злокачественных опухолей. Альтернативно, антитело к huCD40 можно использовать в сочетании с другим средством, например, другими иммуногенными средствами, стандартными противоопухолевыми видами лечения или другими антителами, как описано ниже.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы лечения рака, например, путем ингибирования роста опухолевых клеток, у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к huCD40 или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело может представлять собой гуманизированное антитело к huCD40, человеческое химерное антитело к huCD40 или гуманизированное не относящееся к человеку антитело к huCD40, например человеческое, химерное или гуманизированное антитело к huCD40, которое конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и по меньшей мере одно из антител к huCD40, конкретно описанных в настоящем документе.

Раковые заболевания, чей рост можно ингибировать с использованием антител согласно настоящему изобретению, включают в себя раковые заболевания, как правило, отвечающие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя следующее: плоскоклеточная карцинома, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), не-NSCLC, глиома, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (например, светлоклеточная карцинома), рак яичника, рак печени, рак толстой и прямой кишки, рак

эндометрия, рак почки (например, почечноклеточная карцинома (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонорефрактерная аденокарцинома предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластома, рак поджелудочной железы, глиобластома (мультиформная глиобластома), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, карцинома толстой кишки и рак (или карцинома) головы и шеи, рак желудка, герминогенная опухоль, детская саркома, синоназальная опухоль из клеток-натуральных киллеров, меланома (например, метастатическая злокачественная меланома, такая как кожная или интраокулярная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карцинома фаллопиевых труб, карцинома эндометрия, карцинома шейки матки, карцинома влагалища, карцинома вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркома мягкой ткани, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичная лимфома ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиома ствола головного мозга, аденома гипофиза, саркома Капоши, эпидермоидная рак, плоскоклеточная рак, Т-клеточная лимфома, вызванные факторами окружающей среды злокачественные опухоли, включая в себя раковые заболевания, вызванные асбестом, рак вирусного происхождения (например, связанная с вирусом папилломы человека (HPV) опухоль) и гематологический рак, происходящие из любой из двух основных линий дифференцировки клеток крови, т.е. миелоидной клеточной линии (которая производит гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной клеточной линии (которая производит В-, Т-, НК-клетки и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CMML), недифференцированный AML (MO), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3 V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как ходжкинская лимфома (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмоцитомидная лимфома, моноцитомидная В-клеточная лимфома, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз у взрослых, мантийноклеточная лимфома, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, Т-клеточная лимфома кишечника, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, Т-лимфобластная лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, острый лимфобластный лейкоз, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, В-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая фунгоидный микоз или синдром Сезари) и лимфоплазмоцитомидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрёма; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая невыраженной миеломой), солитарная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; гемопоэтические опухоли миелоидного происхождения, опухоли мезенхимального происхождения, включая в себя фибросаркому и рабдомиосаркому; семинома, тератокарцинома, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая в себя астроцитому, шванному; опухоли мезенхимального происхождения, включая в себя фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая в себя следующее: меланома, пигментная ксероидерма, кератоакантома, семинома, фолликулярная рак щитовидной железы и тератокарцинома, гемопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая в себя без ограничения Т-клеточные нарушения, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая в себя лейкоз мелко-клеточного и церебриформного клеточного типа; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL) предпочтительно Т-клеточного типа; a/d T-NHL лимфома печени и селезенки; лимфома из периферических/посттимульных Т-клеток (плеоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическая (назальная) Т-клеточная лимфома; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острая миелоидная лимфома, а также любые комбинации указанных заболеваний раком. Описанные в настоящем документе способы также можно использовать для лечения метастатического рака, рефрактерных злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, рефрактерных к предыдущей иммунотерапии, например, с помощью блокирующего антитела к CTLA-4 или PD-1) и рецидивирующего рака.

Антитело к huCD40 можно вводить в виде монотерапии или в виде единственной иммуностимулирующей терапии, или его можно комбинировать с иммуногенным средством в стратегии противоопухо-

левых вакцин, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая в себя рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004), *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные, чтобы экспрессировать цитокин GM-CSF. Были разработаны многие экспериментальные стратегии вакцинации против опухолей (см. Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, p. 3023-3043 в DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). В одной из указанных стратегий вакцину получают с использованием аутологических или аллогенных клеток опухоли. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцированы, чтобы экспрессировать GM-CSF. GM-CSF, как было показано, представляет собой мощный активатор презентации антигена для вакцинации опухоли. Dranoff et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90:3539-43.

Изучение экспрессии генов и крупномасштабных профилей экспрессии генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов. Rosenberg, S.A. (1999), *Immunity*, 10:281-7. Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессированные в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100 антигены MAGE и Trp-2. Что еще более важно, может быть показано, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных у хозяина. Агонисты CD40 можно использовать в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, с целью получения иммунного ответа на эти белки. Указанные белки в норме рассматриваются иммунной системой как собственные антигены, и поэтому она толерантна к ним. Опухолевый антиген может также включать в себя белок-теломеразу, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% видов рака человека и находится только в ограниченном числе соматических тканей (Kim et al. (1994), *Science*, 266:2011-2013). Опухолевый антиген может также представлять собой "неоантигены", экспрессированные в злокачественных клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотии из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки от вирусов, вовлеченные в развитие рака человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса саркомы Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, который можно использовать в сочетании с ингибированием CD40, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой ткани опухоли. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP высокоэффективны при доставке в антигенпрезентирующие клетки для вызова опухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995), *Science*, 269:1585-1588; Tamura et al. (1997), *Science*, 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) представляют собой мощные антигенпрезентирующие клетки, которые можно использовать для примирования антигенспецифических ответов. DC можно получить *ex vivo* и нагрузить различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998), *Nature Medicine*, 4:328-332). DC могут быть также трансдуцированы генетическими средствами, чтобы экспрессировать эти опухолевые антигены. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler et al. (2000), *Nature Medicine*, 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизация DC можно эффективно комбинировать с агонизмом CD40, чтобы активировать (реализовать) более мощные противоопухолевые ответы.

Агонизм CD40 также можно комбинировать со стандартными видами лечения рака (например, операцией, облучением и химиотерапией). Агонизм CD40 можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях может быть возможным снижение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokuy et al. (1998), *Cancer Research*, 58:5301-5304). Пример такой комбинации представляет собой антитело к huCD40 в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другой пример такой комбинации представляет собой антитело к huCD40 в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения агонистов CD40 с химиотерапией заключается в том, что гибель клеток, которая представляет собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышенному содержанию опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другие комбинированные способы лечения, которые могут приводить к синергии с агонизмом CD40 через клеточную гибель, представляют собой облучение, операцию и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в организме хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с агонистами CD40. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые

могут поставлять опухолевый антиген в антигенпрезентирующие пути хозяина.

Описанные в настоящем документе антитела к huCD40 также можно использовать в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецепторы Fc α или Fc γ эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно использовать для нацеленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела к Fc-рецепторам/к опухолевым антигенам (например, Her-2/neu) использовали для нацеленного воздействия макрофагами на места расположения опухолей. Это нацеленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифические ответы. Т-клеточная ветвь указанных ответов будет увеличена за счет агонизма CD40. Альтернативно, антиген можно доставить непосредственно в DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим маркером клеточной поверхности дендритных клеток.

Опухоли избегают иммунологического надзора хозяина с помощью большого разнообразия механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации иммуносупрессорных белков, которые экспрессируются опухолями. Они включают в себя среди прочих TGF- β (Kehrl et al. (1986), *J. Exp. Med.* 163:1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992), *Immunology Today*, 13:198-200) и лиганд Fas (Hahne et al. (1996), *Science*, 274:1363-1365). Антитела к каждой из этих структур можно использовать в комбинации с антителами к huCD40, чтобы противодействовать эффектам иммуносупрессорного средства и способствовать противоопухолевым иммунным ответам в организме хозяина.

Антитела к CD40 способны эффективно заменить активность хелперных Т-клеток. Ridge et al. (1998), *Nature*, 393:474-478. Активация антител к костимулирующим Т-клетки молекулам, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg et al. (2000), *Immunol.* 164:2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997), *Nature Medicine*, 3:682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999), *Nature*, 397:262-266), может также обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. Ингибиторы PD1 или PD-L1 также можно использовать в сочетании с антителами к huCD40.

Существуют также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают в себя *ex vivo* активацию и экспансию антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам, чтобы стимулировать антигенспецифические Т-клетки против опухоли (Greenberg & Riddell (1999), *Science*, 285:546-551). Указанные способы также можно использовать для активации Т-клеточных ответов на инфекционные патогены, такие как CMV. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии антител к CD40 увеличит частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Хронические вирусные инфекции.

Согласно другому аспекту описанное в настоящем документе настоящее изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающему введение субъекту антитела к huCD40 или его антигенсвязывающего фрагмента так, чтобы лечить инфекционное заболевание у субъекта.

Аналогично его применению к опухолям, как обсуждалось выше, опосредованный антителом к CD40 агонизм можно использовать отдельно или в качестве адьюванта, в комбинации с вакцинами, чтобы усилить иммунный ответ на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход является особенно применимым, включают в себя патогены, для которых в настоящее время отсутствует эффективная вакцина, или патогены, для которых общепринятые вакцины не являются абсолютно эффективными. Они включают в себя без ограничения ВИЧ, гепатиты (А, В и С), грипп, герпес, ямблию, малярию лейшманию, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Агонизм CD40 является особенно применимым против развившихся инфекций, вызванных такими агентами, как ВИЧ, которые представляют измененные антигены во время всего течения инфекций. Указанные новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения антитела к CD40 человека, таким образом вызывая сильный Т-клеточный ответ.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, которые поддаются лечению способами, описанными в настоящем документе, включают в себя ВИЧ, вирус гепатита (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирсы, эховирус, риновирус, вирус коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, HTLV (вирус Т-клеточного лейкоза человека), вирус денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус Джона Каннингема и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, которые поддаются лечению способами, описанными в настоящем документе, включают в себя хламидии, риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллы, протей, серратии, псевдомонады, легионеллы, возбудителей дифтерии, сальмонеллы, бациллы, возбудителей холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекционные заболевания, которые поддаются лечению способами, описанными в настоящем документе, включают в себя *Candida (albicans)*,

krusei, glabrata, tropicalis и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus (fumigatus, niger* и т.д.), род *Mucorales* (*mucor, absidia, rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных простейших, вызывающих инфекционные заболевания, которые поддаются лечению способами, описанными в настоящем документе, включают в *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеуказанных способах агонизм CD40 можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами, которая обеспечивает усиленную презентацию опухолевых антигенов. См., например, Holliger (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90:6444-6448; Poljak (1994), Structure, 2:1121-1123.

Адьюванты вакцин.

Описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно использовать для усиления антигенспецифических иммунных ответов путем совместного введения антитела к huCD40 с представляющим интерес антигеном, например вакциной. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающие введение субъекту (i) антигена и (ii) антитела к huCD40 или его антигенсвязывающего фрагмента так, чтобы усиливать иммунный ответ на антиген у субъекта. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогенного микроорганизма. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя те, которые обсуждались в предыдущих разделах, такие как опухолевые антигены (или противоопухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Подходящие пути введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов), описанных в настоящем документе *in vivo* и *in vitro*, хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны средними специалистами. Например, композиции антител можно вводить путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозировки используемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта и концентрации и/или состава композиции антител.

Как было описано ранее, описанные в настоящем документе антитела к huCD40 можно вводить совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например цитотоксическим средством, радиотоксическим средством или иммуносупрессорным средством. Антитело может являться связанным со средством (в виде иммунокомплекса) или его можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно со средством или его можно вводить совместно с другими известными видами лечения, например противоопухолевой терапией, например облучением. Такие терапевтические средства включают в себя, среди прочего, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамид, гидроксимочевина, которые сами по себе являются эффективными только на уровнях, которые являются токсическими или субтоксическими для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл каждые четыре недели и адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз в 21 день. Совместное введение антител к CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, с химиотерапевтическими средствами, обеспечивает два противоопухолевых средства, которые действуют через разные механизмы, что приводит к цитотоксическому действию на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы, вызванные развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что может сделать их не реакционноспособными в отношении антитела.

В объеме, описанный в настоящем документе, также включены наборы, содержащие композиции антител, описанные в настоящем документе (например, антитела человека, биспецифические или мультиспецифические молекулы или иммуноконъюгаты), и инструкции для применения. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или один или несколько дополнительных антител человека, описанных в настоящем документе (например, человеческое антитело, характеризующееся взаимодополняющей активностью, которое связывается с эпитопом в антигене CD40, отличным от первого антитела человека). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, на которой указано предусмотренное применение содержимого набора. Термин "этикетка" включает в себя любой письменный или печатный материал, поставляемый на наборе или с набором или который сопутствует набору иным образом.

Виды комбинированной терапии.

В дополнение к видам терапии с использованием комбинаций, предусмотренным выше, описанные в настоящем документе антитела к CD40 также можно использовать в комбинированной терапии, например, для лечения рака, как описано ниже.

Настоящее изобретение относится к способам комбинированной терапии, в которых антитело к

huCD40 вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например антителами, которые являются эффективными в стимулировании иммунных ответов, чтобы, тем самым, дополнительно усиливать, стимулировать или положительно регулировать иммунные ответы у субъекта.

Как правило, описанное в настоящем документе антитело к huCD40 можно комбинировать с (i) агонистом другого костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на Т-клетках, любой из которых приводит к усилению антигенспецифических Т-клеточных ответов (регуляторы контрольных точек иммунного ответа). Большинство костимулирующих и коингибирующих молекул представляют собой представителей суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и описанные в настоящем документе антитела к CD40 можно вводить со средством, которое нацеленно воздействует на представителя семейства IgSF для увеличения иммунного ответа. Одно важное семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, представляет собой семейство B7, которое включает в себя B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другое семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, представляет собой семейство TNF молекул, которые связываются с представителями семейства когнатных рецепторов TNF, которые включают в себя CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009), Drug Discovery Today 00:1).

Согласно другому аспекту антитела к huCD40 можно использовать в комбинации с антагонистами цитокинов, которые ингибируют Т-клеточную активацию (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF или другие "иммуносупрессорные цитокины" или цитокины, которые стимулируют Т-клеточную активацию, для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Агонистические антитела к huCD40 и комбинированные виды терапии с помощью антител, описанные в настоящем документе, также можно использовать в сочетании с другими хорошо известными видами терапии, которые выбирают на основании их конкретной применимости в отношении показания, подлежащего лечению (например, рака). Комбинации описанных в настоящем документе агонистических антител к huCD40 можно использовать последовательно с известным(и) фармацевтически приемлемым(и) средством(ами).

Например, агонистические антитела к huCD40 и комбинированные виды терапии с помощью антител, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным лечением, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием следующего: камптотecin (CPT-11), 5-фторурацил (5-FU), цисплатин, доксорубин, иринотекан, паклитаксел, гемцитабин, цисплатин, паклитаксел, карбоплатин-паклитаксел (Таксол), доксорубин, 5-fu или камптотecin + апо21/TRAIL (6X combo)), один или несколько ингибиторов протеасомы (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитор индоламинадиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360, AT-101 (R(-)-производное госсипола), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или антагонисты MCL-1 (белок 1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонисты iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярный smac-миметик, синтетические smac-пептиды (см. Fulda et al., Nat. Med. 2002; 8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20- (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, нацеленные на VEGF и VEGFR (например, AVASTIN®), синтетические тригерпеноиды (см. Huer et al. Cancer Research, 2005; 65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточный ингибирующий FLICE белок) (например, природные и синтетические лиганды PPAR γ (активированный пролифератором пероксисом рецептор γ), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиrolimus, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиrolimus, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-АКТ, леналилдомид, ингибиторы GSK3P, ингибиторы LAP и/или генотоксические лекарственные средства.

Агонистические антитела к huCD40 и комбинированные виды терапии с помощью антител, описанные в настоящем документе, можно дополнительно использовать в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно использовать в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя без ограничения следующие:

Алкилирующие средства (включая в себя без ограничения азотистые иприты, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™), фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфид, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включая в себя без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пири-

мидина, аналоги пуринов и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, пентастатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинации с агонистическими антителами к huCD40 без ограничения представляют собой следующее: таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорозид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]-дегидродезоксипотилоны В, C12,13-циклопропил-эпотилон А, соединенный мостиком C₆-C₈ эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, АВJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), IЛX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин В, эрибулин мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТI-286), Е-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтансиноидов (DM-1), MKC-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинезиб), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки средствам, известным в настоящей области техники.

В тех случаях, когда желательно перевести аберрантно пролиферативные клетки в состояние покоя в сочетании с лечением агонистическими антителами к huCD40, описанными в настоящем документе или до него, гормоны и стероиды (включая в себя синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостенолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилстеростерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклютетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZOLADEx™, также можно вводить пациенту. При использовании описанных в настоящем документе способов или композиций другие средства, применяемые для модуляции роста опухоли или метастазирования в клинических условиях, такие как антимиометики, также можно вводить по желанию.

Специалистам в настоящей области техники известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в Справочнике врачей (PDR), например, издание 1996 года (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Химиотерапевтическое(ие) средство(а) и/или лучевую терапию можно вводить в соответствии с терапевтическими протоколами, хорошо известными в настоящей области техники. Специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что введение химиотерапевтического(их) средства(средств) и/или лучевой терапии может варьировать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известных эффектов химиотерапевтического(их) средства(средств) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, в соответствии со знаниями квалифицированного врача, терапевтические протоколы (например, количество доз и время введения) могут варьировать в зависимости от наблюдаемого влияния вводимых терапевтических средств на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические средства.

Настоящее раскрытие дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует толковать как дополнительное ограничение. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных заявок на выдачу патентов, приведенных в настоящем описании, явно включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1.

Получение гуманизированных мышей CD40/FcγR.

Для создания точной и эффективной модели, которая может легко оценить активность человеческих Fc-вариантов к CD40 и обеспечить выбор оптимизированного клинического кандидата, создали уникальную мышиную модель, гуманизированную в отношении CD40 и FcγR. Сначала создавали гуманизированных в отношении CD40 мышей в дефицитном в отношении CD40 мыши генетическом окружении. Оценивали профиль экспрессии трансгена ВАС CD40 человека на различных популяциях иммунных клеток у указанных мышей и обнаружили, что экспрессия CD40 человека на популяциях присутствующих в крови В-клеток, дендритных клеток, моноцитов и макрофагов, но не на популяциях Т-клеток, нейтрофилов и NK-клеток является сходной с профилем, встречающимся на клетках человека и их мышинных ортологах (фиг. 1А).

Функциональность трансгена huCD40 у указанных мышей подтверждали путем оценки образования зародышевых центров (GC), процесса, для которого необходима передача сигналов CD40 (Basso et al. (2004), Blood, 104, 4088-4096). Наряду с тем, что CD40^{-/-} мыши теряли способность образовывать GC, этот фенотип восстанавливался при введении трансгена huCD40, фиг. 1В, опосредовано взаимодействием huCD40 с мышинным лигандом CD40, который характеризуется кинетикой связывания и аффинностью,

сходными с лигандом CD40 человека, фиг. 2. CD40^{-/-} мыши характеризовались дефицитным ответом антигенспецифических IgG при иммунизации, который восстанавливался при введении трансгена huCD40, фиг. 1C, подтверждая, что трансген hCD40 функционально взаимодополняет дефицит CD40 мыши. Обобщенно указанные данные демонстрируют, что гуманизированные в отношении CD40 мыши повторяют профиль экспрессии и функцию гена человека. Для создания мышшиной модели, в которой можно оценить полностью человеческие агонистические IgG против CD40 человека, указанных гуманизированных в отношении CD40 мышши скрещивали с ранее описанными гуманизированными в отношении FcγR мышши (охарактеризованными подробно в (DiLillo and Ravetch (2015), Cell, 161, 1035-1045; Smith et al. 2012, PNAS (USA), 109, 6181-6186), получая в результате линию мышши, экспрессирующую CD40 человека и альфа-цепи генов FCGR1A, FCGR2AR131, FCGR2BI232, FCRG3AF158 и FCGR3B под контролем их эндогенных человеческих регуляторных элементов на изогенном генетическом окружении, из которого удалены гомологичные гены мышши.

FcγRα-null мышши содержат делецию Fcgr2b, Fcgr3 и Fcgr4 α-цепи FcγR, и их скрещивают с FcγRI^{-/-} мышши (Barnes et al. 2002, Immunity, 16, 379-389. Их создавали в C57BL/6 генетическом окружении и определяли их характеристики, как описано ранее (Smith, et al. (2012), PNAS USA, 109, 6181-6186). Гуманизированных в отношении FcγR мышши (FcγRα-null, hFcγRI⁺, FcγRIIa^{R131+}, FcγRIIb⁺, FcγRIIIa^{F158+} и FcγRIIIb⁺) создавали и разносторонне охарактеризовали, как описано ранее (Smith, et al. (2012), PNAS (USA), 109, 6181-6186). Трансгенных в отношении CD40 человека мышши получали в C57BL/6 генетическом окружении с помощью пронуCLEARной инъекции линейаризированной ВАС ДНК RP11-177B15 (Osoegawa, et al. (2001), Genome Research 11, 483-496) и скрещивали с нокаутными в отношении CD40 ("CD40^{-/-}") мышши (The Jackson Laboratory) для получения CD40^{-/-}huCD40^{+/+} мышши. CD40^{-/-}huCD40^{+/+} мышши скрещивали с гуманизированными в отношении FcγR мышши для получения гуманизированных в отношении CD40 и FcγR мышши (называемых "hCD40/FcγR"), содержащих генотип CD40^{-/-}hCD40⁺Fcgrα^{-/-}Fcgr^{-/-}hFCGRI⁺hFCGRIIa⁺hFCGRIIb⁺hFCGRIIIa⁺hFCGRIIIB⁺. hCD40/hFcRIIB⁺/hFcRIIA⁺ и hCD40/hFcRIIB⁺/hFcRIIA⁻ мышши, описанных на фиг. 4D, получали во время скрещивания, описанного для создания hCD40/FcγR мышши.

Пример 2.

OVA-специфический Т-клеточный ответ.

Мышши иммунизировали посредством i.p. инъекции с помощью 2 мкг DEC-OVA (mIgG1-D265A) (полученного, как описано ранее (Li and Ravetch (2011), Science, 333, 1030-1034) в присутствии или при отсутствии 10 мкг IgG к CD40 (за исключением ChiLob IgG, которые использовали в дозе 40 мкг/мышшь) с одним из различных Fc. Через 7 дней периферическую кровь собирали и окрашивали с помощью тетрамера H-2^b FITC-конъюгированного анти-CD4, APC-конъюгированного анти-CD8α и PE-конъюгированного пептида OVA SIINFELK (tet-OVA, Beckman Coulter) и анализировали на BD LSRFortessa.

Пример 3.

Проточная цитометрия.

Клеточные популяции определяли с помощью следующих маркеров; DC (человек: HLA-DR⁺BDCA1⁺CD209⁺CD3⁻CD14⁺CD19⁺CD59⁻; мышшь: CD11b⁺CD11c⁺MHCII^{F4/80}), моноциты (человек: CD14⁺HLA-DR⁺CD15⁻; мышшь: CD11b⁺Ly6C^{F4/80}CD11c⁻), макрофаги (человек: CD14⁺CD68⁺; мышшь: CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁺Ly6G⁻); В-клетки (человек: CD19⁺; мышшь: B220⁺), Т-клетки (человек: CD3⁺CD56⁻; мышшь: CD3), NK-клетки (человек: CD16⁺CD56⁺CD3⁻; мышшь: NK1.1), нейтрофилы (человек: CD15⁺CD16⁺CD49d⁻; мышшь: CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}F4/80).

Пример 4.

Иммунизация H1N1.

Мышши иммунизировали с помощью рекомбинантного H1N1 гриппа (Sino Biological Inc.) в присутствии Alum в качестве адьюванта. Через 11 дней кровь собирали и анализировали в отношении специфического к H1N1 гриппа IgG с использованием стандартного протокола ELISA.

Пример 5.

SPR.

Все эксперименты проводили с помощью системы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore T100 (Biacore, GE Healthcare), как описано ранее (Bournazos, et al., 2014, Cell, 158, 1243-1253). Вкратце, эксперименты проводили при 25°C в HBS-EP+ буфере (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 3,4 mM EDTA; 0,005% (об./об.) поверхностно-активного вещества P20). Для измерения аффинности варианты подкласса IgG для FcγR и IgG к рекомбинантному CD40 иммобилизовали на чипах Series S CM5 с помощью аминного сочетания и растворимые эктодомены образцов FcγR или CD40 вводили через проточные ячейки при различных концентрациях. Для некоторых FcγR измерения повторяли в противоположной ориентации при иммобилизации FcγR и введении растворимых IgG. Вычитали фоновое связывание с холостыми иммобилизованными проточными ячейками и константы аффинности рассчитывали с использованием программного обеспечения оценки Biacore T100 (GE Healthcare) с использованием 1:1 модели связывания Ленгмюра.

Пример 6.

Конкурентный анализ на основе SPR.

Конкурентные эксперименты SPR проводили на приборе Biacore T100 с использованием подвижного буфера, содержащего 10 мМ фосфата натрия, 130 мМ хлорида натрия, 0,05% Tween 20, pH 7,1 при 25°C, на поверхности, состоящей из hCD40-Fc, иммобилизованного на сенсорном чипе CM5, с использованием стандартного аминного сочетания. Конкуренцию за связывание с hCD40L-Fc оценивали с использованием функции "двойная инъекция" ("dual injection") в управляющем программном обеспечении T100 путем инъекции молекулы 1 (исходное антитело или CD40L), сразу за которой следует инъекция концентрации молекулы 1 или смеси молекулы 1 вместе с молекулой 2. Ответы связывания сравнивали с контрольной инъекцией молекулы 2 отдельно. Все эксперименты проводили с использованием 180 с периодов времени ассоциации и диссоциации со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин. Поверхность успешно восстанавливали между циклами с использованием двух 15 с импульсов, содержащих 10 мМ глицина, pH 1,5 со скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин.

Пример 7.

ELISA связывания CD40.

Специфичность и аффинность связывания подклассов IgG определяли с помощью ELISA с использованием рекомбинантного CD40 (Sino Biological Inc.). Планшеты для ELISA (Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C с помощью рекомбинантного внеклеточного домена CD40 человека (1 мкг/лунка). Все последующие стадии проводили при комнатной температуре. После отмывки планшеты блокировали в течение 1 ч с помощью PBS/2% обезжиренного молока и впоследствии инкубировали в течение 1 ч с серийно разведенными IgG (1:3 последовательные разведения в PBS/2% обезжиренном молоке). После отмывки планшеты инкубировали в течение 1 ч с конъюгированным с HRP антителом к IgG человека (Jackson ImmunoResearch). Обнаружение проводили с использованием двухкомпонентного набора субстрата пероксидазы (KPL) и реакции останавливали с помощью добавления 1 М ортофосфорной кислоты. Поглощение при 405 нм регистрировали сразу с использованием спектрофотометра SpectraMax Plus (Molecular Devices) и вычитали фоновое поглощение из образцов - отрицательного контроля.

Пример 8.

Создание и получение Fc-вариантов к CD40.

Вариабельные тяжелые и легкие области клона 21.4.1 Ab к CD40 человека (патент США № 7338660) синтезировали (Genzyme) и клонировали в экспрессионные векторы млекопитающего с каркасами IgG1 человека, IgG2 человека или каппа Fc человек, как описано ранее (Li and Ravetch (2011), Science, 333, 1030-1034). Для создания вариантов Fc-домена IgG1 человека (N297A, S267E, S267E/L328F, G237D/P238D/P271G/A330R, G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) и IgG2 человека (C127S, C232S), сайт-направленный мутагенез с использованием специфических праймеров проводили на основании набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange site-directed mutagenesis Kit II (Agilent Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Мутированные последовательности плазмиды подтверждали путем прямого секвенирования (Genewiz).

Антитела создавали путем транзientной трансфекции клеток HEK293T (ATCC), очищали с использованием смолы Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare), подвергали диализу в PBS и подвергали стерилизационному фильтрованию (0,22 мкм), как описано ранее (Nimmerjahn, et al. (2005), Immunity, 23, 41-51). Чистоту оценивали с помощью SDS-PAGE и окрашивания Кумасси, и, по оценкам, она составляла >90%. Ab, используемые для *in vivo* экспериментов, количественно оценивали в отношении примесей эндотоксина (LPS) с помощью анализа лизата амёбоцитов мечехвоста (LAL) и подтверждали, что они характеризуются уровнями <0,1 ЕЭ/мкг. Поликлональный IgG человека приобретали у Bio X Cell.

Пример 9.

Стимуляция и лечение опухолей.

Клетки MC38 (2×10^6) имплантировали подкожно и объемы опухоли измеряли каждые 2-3 дня с помощью электронного циркуля и регистрировали в виде объема с использованием формулы $(L_1^2 \times L_2)/2$, где L_1 представляет собой самый короткий диаметр и L_2 представляет собой самый длинный диаметр. Через 7 дней после инокуляции опухоли мышей рандомизировали по размеру опухоли (день 0) и вводили интраперитонеальную (*i.p.*) инъекцию 200 мкг IgG к CD40 или контрольных IgG. Мыши получали дополнительное лечение 200 мкг IgG на 3 день. Для модели метастазирования в легкие В16 мышам вводили инъекцию внутривенно с 1×10^6 В16-F10 клетками и лечили с помощью 40 мкг указанных Ab в дни 1 и 4 после инъекции опухолевых клеток. На 14 день легкие собирали и анализировали в отношении присутствия поверхностных очагов метастазирования с использованием препаровальной лупы.

Пример 10.

Создание клинических кандидатов Fc-вариантов к CD40 человека.

Для исследования того, требует ли *in vivo* активность IgG человека, нацеленных на CD40 человека, взаимодействия с huFcγRIIB, и определить, можно ли такие взаимодействия дополнительно сконструировать для оптимизации активности исходного антитела, вариабельные области клона к 2141CD40 (CP-870,893, изначально изотип IgG2) клонировали в Fc-модифицированные Ab с различной способно-

стью взаимодействовать с FcγR человека. Они включают в себя относящиеся к дикому типу IgG1 человека и серию мутированных IgG1 с увеличенными аффинностями связывания по отношению к huFcγRIIB. ELISA, фиг. 1D, и SPR (табл. 3) подтвердили, что различные Fc-домены, введенные в Ab клона 2141 не изменяли ни их специфичность связывания, ни их аффинность по отношению к CD40 человека. В табл. 4 обобщенно представлены аффинности различных Fc-вариантов клона 2141 к рекомбинантным huFcγRI, hFcγRIIA, huFcγRIIB и huFcγRIIIA, что оценивали с помощью SPR.

Таблица 3

Fc-вариант	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
IgG1	5.973 *10 ⁴	1.189*10 ⁻³	1.991*10 ⁻⁸
IgG1-N297A	5.234 *10 ⁴	1.161*10 ⁻³	2.219*10 ⁻⁸
IgG1-S267E	4.999 *10 ⁴	1.155*10 ⁻³	2.309*10 ⁻⁸
IgG1-S267E/L328F	4.232 *10 ⁴	1.159*10 ⁻³	2.738*10 ⁻⁸
IgG1- G237D/P238D/P271G /A330R (V9)	4.217 *10 ⁴	1.129*10 ⁻³	2.678*10 ⁻⁸
IgG1- G237D/P238D/H268D /P271G/A330R (V11)	4.1 *10 ⁴	1.125*10 ⁻³	2.743*10 ⁻⁸
IgG2	3.486*10 ⁴	1.081*10 ⁻³	3.101*10 ⁻⁸
IgG2- C232S (IgG2A)	3.515*10 ⁴	1.088*10 ⁻³	3.095*10 ⁻⁸
IgG2- C127S (IgG2B)	3.549 *10 ⁴	1.096*10 ⁻³	3.088*10 ⁻⁸

Константы связывания получали с помощью анализа SPR с иммобилизованными IgG и растворимым CD40.

Таблица 4

Fc-вариант	ингибирующий		активирующий					
	hFcγRIIB		hFcγRI		hFcγRIIA ^{R131}		hFcγRIIIA ^{F158}	
	K _D (M)	Fold	K _D (M)	кратность	K _D (M)	кратность	K _D (M)	кратность
IgG1 дикого типа	3.01 x 10 ⁻⁶	1	5.17 x 10 ⁻⁹	1	1.16 x 10 ⁻⁶	1	6.7 x 10 ⁻⁶	1
N297A	n.d.b	NA	n.d.b	NA	n.d.b	NA	n.d.b	NA
SE	8.33 x 10 ⁻⁸	30.2	2.6 x 10 ⁻⁹	1.1	9.8 x 10 ⁻⁶	15.8	n.d.b	NA
SELF	4.31 x 10 ⁻⁸	69.8	3.68 x 10 ⁻⁹	1.4	1.77 x 10 ⁻⁸	65.5	n.d.b	NA
V9	9.39 x 10 ⁻⁸	32	5.78 x 10 ⁻⁷	0.009	4.11 x 10 ⁻⁶	0.28	n.d.b	NA
V11	3.15 x 10 ⁻⁸	95.6	2.3 x 10 ⁻⁷	0.022	3.84 x 10 ⁻⁶	0.3	n.d.b	NA
IgG2	<10 ⁻⁵	NA	n.d.b	NA	<10 ⁻⁵	NA	<10 ⁻⁵	NA

Константы связывания получали с помощью анализа SPR.

Кратность=K_D(IgG1)/K_D(Fc-вариант).

n. d. b, нет обнаруживаемого связывания; NA, нет данных.

Значения K_D и кратность изменений по сравнению с IgG1 дикого типа для мутанта SE получали из ссылок (Smith et al. и Chu et al., 2008).

Пример 11.

Взаимодействие с FcγR необходимо для *in vivo* активности человеческих mAb к CD40.

Наряду с тем, что изотип IgG1 характеризуется относительно высокой аффинностью взаимодействий со всеми FcγR человека, изотип IgG2 CP-870,893 характеризуется очень низкими аффинностями связывания с FcγR человека, за исключением FcγRIIA^{R131} (фиг. 3A и табл. 4). Эффективность изотипов IgG1 и IgG2 к CD40 *in vivo* в контексте FcγR человека сравнивали путем исследования их способности активировать и осуществлять экспансию Т-клеток в гуманизированной в отношении CD40/FcγR модели. Овалбумин (OVA) доставляли к дендритным клеткам с помощью химерного Ab к DEC205, конъюгированного с OVA ("DEC-OVA" (Li and Ravetch (2011), Science, 333, 1030-1034)) вместе с любым из IgG1-Fc человека, IgG2-Fc человека или N297A Fc-null подклассов mAb к CD40 CP-870,893 и подвергали мониторингу в отношении присутствия OVA-специфических Т-клеток в кровотоке через 7 дней (фиг. 3B). Наряду с тем, что как изотип IgG1, так и изотип IgG2 характеризовались адьювантными эффектами на Т-клеточную активацию, IgG1 приводил к значительно более высокому Т-клеточному ответу по сравнению с изотипом IgG2 одного и того же клона к CD40. Активность IgG1 полностью отменялась путем введения мутации N297A, которая предотвращает связывание с FcγR, указывая на то, что взаимодействие с FcγR необходимо для агонистической активности IgG1 к CD40. Значительная активность IgG2 утрачивалась при исследовании в виде дегликозилированной формы, которая характеризуется сниженной аффинностью связывания с FcγRIIB по сравнению с IgG2 дикого типа. Это указывает также на FcγR-зависимую активность IgG2 к CD40 и дает основание предположить, что относительно сниженную активность IgG2 по сравнению с изотипом IgG1 можно объяснить его низкими аффинностями связыва-

ния с FcγR человека. В отличие от этого вывода, агонистическая активность антитела к CD40 подкласса IgG2, как предполагали, являлась FcγR-независимой и представляла собой результат уникальной конфигурации шарнира IgG2 (White, et al. (2015), *Cancer Cell*, 27, 138-148), опосредованной "перетасованными" дисульфидными связями между шарниром IgG2 и областями C_H1. Для исследования этой возможности конкретные цистеины CP-870,893 мутировали, что привело к замкнутым конформационным формам - классической Y-конформации "IgG2-A" и более компактной конформации "IgG2-B", полученной с помощью мутаций C232S и C127S соответственно (Allen et al. 2009, *Biochemistry*, 48, 3755-3766). Обе формы IgG2 приводят к активности, сходной с IgG2 дикого типа, указывая на то, что конформация шарнирной области не определяет *in vivo* агонистическую активность изоформа IgG2 этого клона Ab в контексте FcγR человека. Более того, *in vivo* агонистическая активность форм IgG2-A и IgG2-B CP-870,893 в трансгенных в отношении CD40 человека мышях в генетическом окружении либо FcγR мыши, либо FcγR человека сравнивали и обнаружили, что в окружении FcγR мыши только форма IgG2-B является активной, тогда как в окружении FcγR человека обе формы характеризуются значительной и сходной активностью. Данные, полученные для Ab CP-870,893, дополнительно поддерживают сходную иерархию в агонистической активности, наблюдаемую для IgG1 и форм 2A и 2B подкласса IgG2 ChiLob 7/4, другого агонистического клона Ab к CD40 человека, который распознает эпитоп, отличный от 2141. Наряду с тем, что подкласс IgG2 ChiLob 7/4, как сообщалось, характеризуется превосходной активностью по сравнению с его формой IgG1 при отсутствии или в присутствии FcγR мыши, также наблюдали, что для этого клона в присутствии FcγR человека подкласс IgG1 превосходит IgG2 и что обе конформационные формы IgG2 характеризуются сходной активностью. Как наблюдалось для CP-870,893, при анализе на huCD40/mFcγR мышях только форма IgG2-B является активной и приводит к значительно усиленной активности по сравнению с IgG2-A.

Эти данные указывают на то, что в физиологическом контексте FcγR человека *in vivo* активность агонистических, человеческих IgG к CD40 зависит от взаимодействия с FcγR, но не от их конформации шарнира. Важно, что данные подчеркивают преимущество использования гуманизированной в отношении FcγR мышшиной модели для изучения надлежащим образом активности IgG человека. Учитывая взаимодействие IgG человека с FcγR человека, указанные мыши позволяют избежать противоречивых результатов, которые можно получить с использованием IgG человека в моделях, содержащих FcγR мыши.

Пример 12.

Оптимизированная активность IgG к CD40 человека, достигаемая с помощью Fc-вариантов, усиленных в отношении связывания с FcγRIIB, но не с FcγRIIA.

Далее определяли, будет ли увеличение взаимодействий связывания между человеческими антителами к CD40 и hFcγRIIB приводить в результате к увеличенной *in vivo* эффективности. Аффинность и селективность связывания IgG человека с hFcγRIIB можно увеличить с помощью мутагенеза их Fc-домена. Fc-варианты CP-870,893, несущие точечные мутации S267E (SE) и S267E/L328F (SELF) (Chu et al. (2008), *Molecular Immunology*, 45, 3926-3933), дают в результате 30- и 70-кратно увеличенную аффинность связывания с hFcγRIIB, соответственно (фиг. 4A и табл. 4). При введении гуманизированным в отношении FcγR/CD40 мышам указанные Fc-варианты приводят к небольшому, но значимому увеличению их способности активировать Т-клетки *in vivo* по сравнению как с IgG1 дикого типа, так и вариантами IgG2 CP-870,893, (фиг. 4B).

Благодаря сходству последовательностей и структурному сходству между hFcγRIIA и hFcγRIIB мутации SE и SELF также приводят к увеличенной аффинности связывания с активирующим hFcγRIIA. Следовательно, несмотря на увеличение их аффинности связывания с ингибирующим hFcγRIIB, соотношение аффинностей связывания с FcγRIIA/FcγRIIB указанных мутированных IgG является сходным с таковым у IgG1 дикого типа, и таким образом, как было предсказано, приводят к ограниченной активности этого подкласса, как это наблюдалось на фиг. 4B. Для оптимизации взаимодействия FcγRIIB с Fc при отсутствии FcγRIIA создали Fc-варианты CP-870,893 с недавно описанными мутациями, G237D/P238D/P271G/A330R (V9) и G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V11), которые усиливают аффинность связывания специфически по отношению к hFcγRIIB, но не к hFcγRIIA (Mimoto et al. (2013), *PEDS*, 26, 589-598). Fc-варианты V9-CP-870,893 и V11-CP-870,893 приводят к 32- и 97-кратно увеличенной аффинности связывания с hFcγRIIB и приблизительно 3-кратно сниженной аффинности связывания с hFcγRIIA^{R131}, (фиг. 4A и табл. 4). Оба Fc-варианта V9 и V11 характеризуются значительно улучшенной *in vivo* активностью по сравнению с подклассом IgG2 CP-870,893 (IgG2), и его SE- и SELF-Fc варианты характеризуются усиленной аффинностью в отношении как hFcγRIIB, так и hFcγRIIA. Вариант 2141-V11 приводит к 25-кратному увеличению Т-клеточной активации по сравнению с CP-870,893-IgG2 и 5-кратному увеличению по сравнению с активностью, полученной с помощью SELF-варианта, (фиг. 4B). Сходную иерархию наблюдали для Fc-вариантов CP-870,893, когда изменению массы тела определяли после введения антител, (фиг. 5A). Наряду с тем, что все исследуемые Fc-варианты приводили к статистически значимым снижениям массы тела после однократной инъекции антитела к CD40, группа, которой вводили инъекцию V11-варианта CP-870,893, характеризовалась наиболее значимым снижением.

Анализировали фармакокинетические (ПК) свойства указанных Fc-вариантов для исследования того, приводят ли их различающиеся связывание с FcγR к различающимся ПК скоростям клиренса, что может объяснять их различающиеся агонистические активности. Обнаружили, что SELF и V11 Fc-варианты CP-870,893 характеризуются более быстрой скоростью клиренса, чем подкласс IgG2 (фиг. 4B), предположительно, в результате их усиленной активности связывания с FcRIIB. Тем не менее, несмотря на тот факт того, что SELF и V11 характеризуются более быстрыми скоростями клиренса, они проявляют превосходную агонистическую активность по сравнению с IgG2. Аналогично, несмотря на сходные ПК свойства SELF и V11, V11 является превосходным агонистом по сравнению с SELF. Поэтому исключено, что возможность того, что различные свойства ПК этих Fc-вариантов объясняют их агонистическую активность.

Влияние взаимодействия с hFcγRIIA на активность CP-870,893 оценивали путем сравнения его активности у мышей, трансгенных в отношении CD40 человека и FcγRIIB человека, но не в отношении FcγRIIA, или мышей, трансгенных в отношении CD40 человека, FcγRIIB человека и FcγRIIA человека (фиг. 4C). Эффективность T-клеточной активации CP-870,893-IgG2 значительно усиливалась при отсутствии FcγRIIA, указывая на отрицательную роль взаимодействия с FcγRIIA на агонистическую активность этого mAb к CD40.

Настоящее изобретение демонстрирует, что инженерия CP-890,873 для усиленного взаимодействия с hFcγRIIB при сохранении низкого соотношения связывания FcγRIIA/FcγRIIB приводит к оптимизированной *in vivo* агонистической активности человеческих IgG к CD40.

Увеличенную иммуностимулирующую активность за счет селективного усиления связывания FcγRIIB продемонстрировали для mAb 2141 (CP-870,893), которое не блокирует связывание hCD40 с CD40L, демонстрируя, что агонистические человеческие mAb к CD40 можно оптимизировать за счет селективного усиления FcγRIIB-связывания посредством Fc-инженерии независимо от их связывающих эпитопов и их способности перекрестно блокировать связывание CD40L с CD40.

Важность взаимодействий с FcγR для наиболее эффективного mAb к CD40 человека продемонстрировали в клинической практике, среди прочего, и то, как селективная манипуляция с FcγR-взаимодействиями с помощью Fc-инженерии усиливает активность указанных лекарственных средств. Эти выводы стали возможными благодаря использованию репрезентативной модели *in vivo*, которая точно отражает разнообразие и специфичность клеточного типа системы FcγR человека.

Настоящее изобретение также опровергает представление о том, что эпитопная специфичность агонистического mAb к CD40 определяет его потребности в FcγR (FcγR-независимый по сравнению с FcγR-зависимым соответственно) для активности. CP-870,893, ChiLob 7/4 не конкурируют со связыванием CD40L, но, как было доказано, являются FcγR-зависимыми для их оптимальной активности *in vivo*.

Различные режимы действия можно наблюдать между различными клонами mAb, хотя они характеризуются общей целевой молекулой. Например, недавно обнаружили, что антагонистические mAb к PD-1 обладают потенциалом обеспечивать FcγRIIB-зависимый агонизм на основании их эпитопной специфичности (Dahan et al. (2015), Cancer Cell, 28, 285-295). Хотя мышинные модели могут быть очень информативными для оценки активности mAb, перевод активности mAb у мыши на терапевтическое средство для человека не является прямым, и терапевтические механизмы, наблюдаемые для мышинного mAb, можно изменить при разработке гомологичных человеческих IgG. Посредством гуманизации как CD40, так и FcγR создали модель мыши, которая позволяет *in vivo* оценивать клинические продукты, рассматривая активность, опосредованную как их Fab-доменами, так и Fc-доменами. Эти мыши обеспечивают возможность выбора "лидера" среди панели человеческих mAb к CD40 на основе их агонистической активности *in vivo*. Аналогичный подход следует использовать для создания мышей, гуманизированных в отношении других терапевтических мишеней в окружении huFcγR для оптимального выбора дополнительных иммуномодулирующих mAb.

Хотя улучшенная агонистическая активность опосредована Fc-вариантами, усиленными как для связывания FcγRIIA, так и FcγRIIB (например, с помощью мутаций Fc S267E или S267E/L328F), их активность ограничена их усиленным связыванием с активирующим FcγRIIA. Таким образом, в настоящем исследовании Fc-варианты с селективным усилением при связывании исключительно с ингибирующим FcγRIIB были отмечены как наиболее эффективные производные mAb к CD40. Отсутствие активности мышинных mAb к CD40, несущих подкласс IgG2a, который предпочтительно связывает активирующие FcγR, связано с истощением CD40-экспрессирующих клеток (Li and Ravetch (2011), Science, 333, 1030-1034). Поскольку FcγRIIA человека, но не FcγR IIA опосредует *in vivo* истощение с помощью mAb (DiLillo and Ravetch (2015), Cell, 161, 1035-1045), а мутанты S267E или S267E/L328F усилены по отношению к FcγRIIA, но не FcγRIIA, сниженная эффективность mAb к CD40, опосредованная FcγRIIA-взаимодействием, не обусловлена истощением CD40-экспрессирующих клеток. Механизм, который объясняет этот ингибирующий эффект за счет FcγRIIA, является предметом текущих исследований. Полиморфизм гистидина (H)/аргинина (R) в положении 131 FcγRIIA обуславливает его аффинность связывания по отношению к IgG2, FcγRIIA^{H131} характеризуется приблизительно в 5 раз более высокой аффинно-

стью к IgG2, чем FcγRIIa^{R131} (van Sorge et al., 2003) Tissue Antigens, 61, 189-202). Из-за ингибирующего эффекта FcγRIIa на активность CP-870,893 пациенты, несущие генотип FcγRIIa^{131H/H}, могут характеризоваться уменьшенным ответом на лечение с помощью CP-870,893. Гуманизированные мыши несут генотип FcγRIIa^{131R/R}, но линию FcγRIIa^{131H/H} создают так, что можно выявить вклад полиморфизма аллелей FcγRIIa в активность mAb к CD40.

Пример 13.

V11 Fc-вариант Ab к CD40 характеризуется превосходной противоопухолевой активностью.

Оценивали, может ли увеличенная агонистическая активность, наблюдаемая для FcγRIIb-усиленных мутированных Fc-вариантов обуславливать увеличенную противоопухолевую активность mAb к CD40. Гуманизированных в отношении CD40/FcγR мышей инокулировали сингенными опухолями аденокарциномы толстой кишки MC38 и лечили с помощью 2141 -IgG2, -SELF и -V11 Fc-вариантов агонистического mAb к CD40 клона 2141. Лечение как с помощью IgG2 (CP-870,893), так и SELF Fc-вариантов приводит к сходным противоопухолевым эффектам (приблизительно 65% снижение объема опухоли по сравнению с не получившим лечение контролем и 20-33% не содержащих опухоль мышей соответственно). Тем не менее лечение с помощью Fc-варианта V11 приводит к весьма значительно улучшенному противоопухолевому ответу и обеспечивает полное выздоровление от опухолей всех мышей в этой группе. Сходный тренд наблюдали с использованием модели метастатической меланомы B16, к которой статистически значимое снижение числа метастазов в легких наблюдали только у мышей, получивших лечение с помощью V11, но не с помощью SELF или IgG2 Fc-вариантов. Эти данные указывают на то, что противоопухолевую активность CP-870,893 можно усилить с помощью Fc-инженерии антитела для обеспечения селективного усиления взаимодействия с FcγRIIb и выделить Fc-вариант V11 этого клона mAb в качестве оптимального клинического кандидата.

Уникальная конформация шарнира IgG2 изотипа человека, как недавно сообщалось, усиливает агонистическую активность mAb к CD40 FcγR-независимым образом. Поэтому предположили, что превосходная агонистическая активность, наблюдаемая для CP-870,893, обусловлена его изотипом IgG2 по сравнению с изотипом IgG1 другого агонистического Ab к CD40 в клинических исследованиях, ChiLob 7/4 и SGN40. Когда ChiLob 7/4 и SGN40 создали в виде IgG2, они привели к усиленной эффективности по сравнению с их исходным изотипом IgG1 (White et al. (2015), Cancer Cell, 27, 138-148). Недостаток этого исследования заключается в том, что mAb оценивали только в присутствии (или при отсутствии) FcγR мыши и их зависимость от изотипа эффективности в правильном контексте FcγR человека не оценивали. В настоящем документе показано, что использование ChiLob 7/4 в виде IgG2 приводит к сниженной активности по сравнению с IgG1 в контексте FcγR человека. Дополнительно оценивали активность IgG1 по сравнению с подклассами IgG2, включая в себя формы 2A и 2B IgG2 как CP-870,893, так и ChiLob 7/4 и обнаружили, что IgG1 является более активным, чем IgG2, и его активность является FcγR-зависимой. Следовательно, сделали вывод, что превосходная агонистическая активность IgG2 к CD40 человека, наблюдаемая у мышей, не релевантна его клинической активности у людей. Более того, относительно высокая активность CP-870,893 по сравнению с другими mAb к CD40 не является результатом изотипа IgG2 и, вероятно, является результатом распознавания mAb уникального специфического агонистического эпитопа. Наконец, селективное усиление для FcγRIIb-связывания на сегодняшний день является наиболее эффективной стратегией усиления эффективности агонизма mAb к CD40.

Таблица 2

Обобщенное представление перечня последовательностей

SEQ ID	Описание
1	Тяжелая цепь CD40 человека (2141)
2	Легкая цепь CD40 человека ¹
3	Тяжелая цепь N297A
4	Тяжелая цепь SE
5	Тяжелая цепь SELF
6	Тяжелая цепь V9
7	Тяжелая цепь V11
8	2141-IgG2 - тяжелая цепь
9	2141-IgG2 C127S - тяжелая цепь
10	2141-IgG2 C232S - тяжелая цепь
11	CD40 человека (NP_001241.1),
12	CD40L человека (NP_000065.1)
13	Сигнальная последовательность

SEQ ID NO: 1 - Тяжелая цепь 2141-IgG1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
ATTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2 - Легкая цепь 2141- IgG1

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWYQQKPKGKA
PNLLIYTAATLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
QQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV

¹ Последовательности легкой цепи для всех Fc-вариантов 2141 (CP-870,893) являются идентичными последовательности SEQ ID NO: 2.

VCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 3 - Тяжелая цепь 2141-IgG1 N297A

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
ATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4 - 2141-IgG1 S267E - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
ATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5 - 2141-IgG1 S267E/L328F - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
ATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH

KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALFPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 6 - 2141-IgG1- G237D/P238D/P271G/A330R (V9) - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
 QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
 RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
 ATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG**DD**SVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDG**EV**KFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**RP**PIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 7 - 2141-IgG1- G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (V11) - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
 QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
 RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
 ATTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG**DD**SVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDV**SD**EDG**EV**KFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**RP**PIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 8 - 2141-IgG2 - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPG
 QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
 RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDH
 KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
 TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 9 - 2141-IgG2 C127S - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPG
 QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
 RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDH
 KPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
 TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10 - 2141-IgG2 C232S - тяжелая цепь

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWRQAPG
 QGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
 RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDH
 KPSNTKVDKTVVERKSCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
 TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 13 Сигнальная последовательность

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHP

В Перечне последовательностей представлены последовательности зрелых тяжелых и легких цепей (т.е. последовательности не включают в себя сигнальные пептиды). Сигнальная последовательность для получения антител согласно настоящему изобретению, например, в клетках человека, представлена в SEQ ID NO: 13.

Эквиваленты.

Специалистам в настоящей области техники будет понятно или они смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены представленной ниже формулой изобретения.

Перечень последовательностей

<110> ЗЭ РОКФЕЛЛЕР ЮНИВЕРСИТИ

<120> АНТИТЕЛА К CD40 С УСИЛЕННОЙ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

<130> 070413.20238 / RU1281 /RUBMS12725-PCT

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 4
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 4

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 5
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 5

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 6
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 6

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 7
<211> 456
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 7

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Thr
115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 8
<211> 452
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
210 215 220

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 9
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic sequence

<400> 9

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg Ser Thr
 130 135 140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
 195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
210 215 220

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 10
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic sequence

<400> 10

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
210 215 220

Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
225 230 235 240

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 11
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 12
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Ala Val His Pro
20

2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывается с CD40 человека и содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

2. Антитело по п.1, причем антитело характеризуется усиленной специфичностью связывания с FcγRIIb.

3. Антитело по п.2, проявляющее соотношение активации к ингибированию (A/I), составляющее менее чем 5.

4. Антитело по п.3, проявляющее соотношение A/I, составляющее менее чем 1.

5. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по п.1.

6. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.5.

7. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.6.

8. Способ получения антитела по п.1, предусматривающий следующее:

а) экспрессия антитела в клетке по п.7 и

b) выделение антитела из клетки-хозяина.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая:

a) антитело по п.1 и

b) носитель.

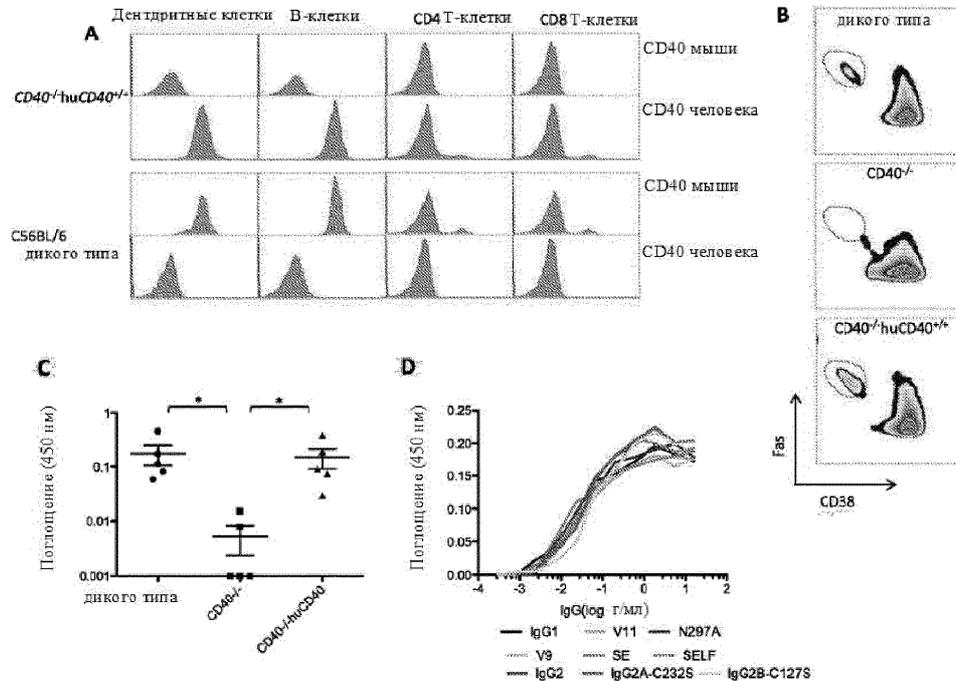
10. Способ стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.9.

11. Способ по п.10, при котором субъект характеризуется наличием хронической вирусной инфекции и при котором стимулируют иммунный ответ против хронической вирусной инфекции.

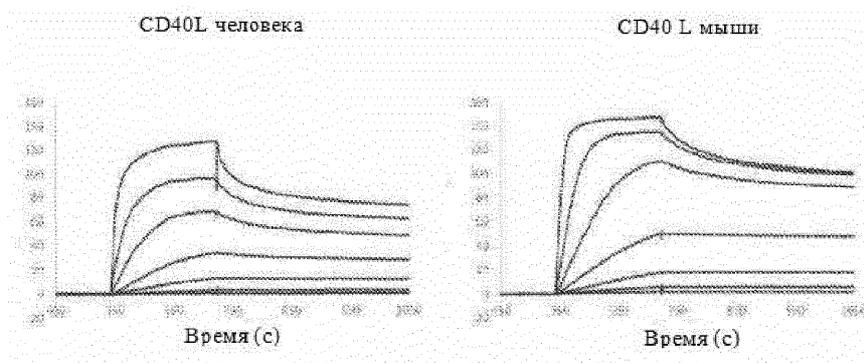
12. Способ лечения рака, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.9.

13. Способ по п.12, при котором рак выбирают из группы, состоящей из следующего: рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легкого, рак желудка, герминогенный рак, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфома, лейкоз, миелома, саркома и рак вирусного происхождения.

14. Способ лечения хронической вирусной инфекции, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела по п.1 или терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.9.



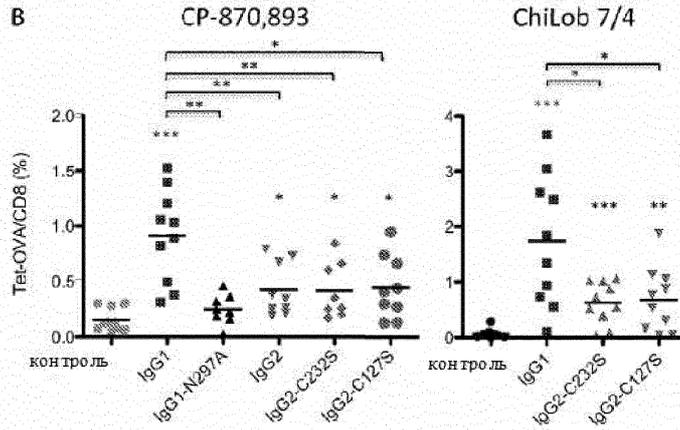
Фиг. 1



Фиг. 2

A Профили аффинностей связывания с FcγR Fc-вариантов клона 2141

2141-Ab подклассы	ингибирующий		активирующий	
	FcγRIIB	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIIA
IgG1	++	+++++	++	++
N297A	-	-	-	-
IgG2 (CP-870,893)	+	-	+	+

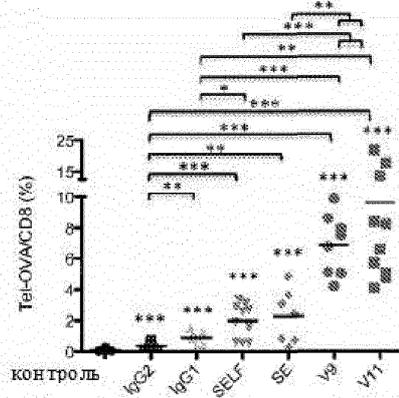


Фиг. 3

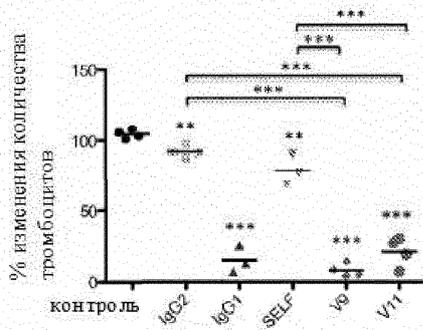
A

вариант	кратность	
	FcγRIIB	FcγRI
IgG1	1	2.7
SELF	70	2.4
SE	30	0.9
V9	32	0.02
V11	96	0.01

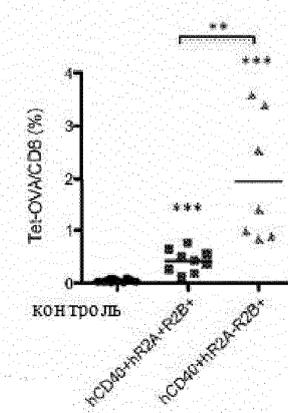
B



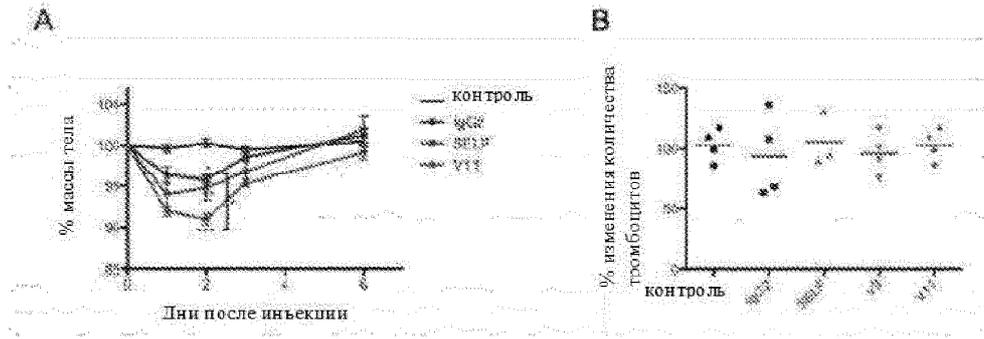
C



D



Фиг. 4



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2