

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

201790932

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.10.29

(54) ДОЗИРОВКА И ВВЕДЕНИЕ НЕФУКОЗИЛИРОВАННЫХ АНТИ-CD40 АНТИТЕЛ

(31) 62/072,031; 62/134,955

(32) 2014.10.29; 2015.03.18

(33) US

(86) PCT/US2015/058108

(87) WO 2016/069919 2016.05.06

(71) Заявитель:

СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)

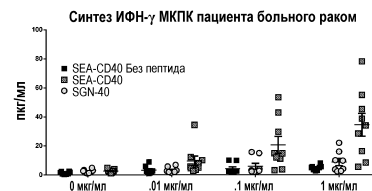
(72) Изобретатель:

Гардай Шира, Ло Чэ-Леунг, Пенг
Стэнфорд, Ян Цзин, Нефф-Лафорд
Хейли (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам применения нефукозилированного анти-CD40 антитела для лечения рака и хронических инфекционных заболеваний.



201790932

A1

A1

201790932

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-541819EA/032

ДОЗИРОВКА И ВВЕДЕНИЕ НЕФУКОЗИЛИРОВАННЫХ АНТИ-CD40 АНТИТЕЛ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на Патент США No.62/072031, поданной 29 октября 2014, и предварительной заявки на Патент США No.62/134955, поданной 18 марта 2015. Обе эти заявки включены в настоящее описание путем ссылки для всех целей.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Настоящее изобретение относится к способам применения нефукозилированного анти-CD40 антитела для лечения рака и хронических инфекционных заболеваний.

Уровень техники изобретения

[0003] CD40 является членом суперсемейства рецепторов факторов некроза опухоли (ФНО). Он представляет собой одноцепочечный трансмембранный белок типа I со средней молекулярной массой 50 кДа. CD40 экспрессируется некоторыми раковыми клетками, например, клетками лимфомы и несколькими типами клеток солидных опухолей. CD40 также функционирует, чтобы активировать иммунную систему путем облегчения контакт-зависимых взаимодействий между антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами. Хотя ряд анти-CD40 антител был протестирован в клинических испытаниях, к настоящему времени ни одно из них не проявило достаточной активности. Настоящее изобретение решает эту и другие проблемы.

Краткая сущность изобретения

[0004] Настоящее изобретение относится к способу лечения рака путем введения анти-CD40 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Анти-CD40 антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека. Эта константная область имеет N-гликозидсвязанную сахарную цепь в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% N-гликозидсвязанных сахарных цепей включают остаток фукозы, т.е.

фукозу, связанную с восстанавливающим концом сахарной цепи через $\alpha 1,6$ связь с N-ацетилглюкозамином («GlcNAc»). Введение анти-CD40 антитела осуществляется в дозе от 0,1 до 300 мкг/кг (мкг антитела на килограмм массы тела пациента). В одном варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет от 0,6 до 150 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет от 1,0 до 100 мкг/кг. В еще одном варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет от 5 до 25 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет от 8 до 12 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет примерно 10 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы анти-CD40 антитела составляет 10 мкг/кг.

[0005] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака путем введения анти-CD40 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Анти-CD40 антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека. Эта константная область имеет N-гликозидсвязанную сахарную цепь в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% N-гликозидсвязанных сахарных цепей включают остаток фукозы, т.е. фукозу, связанную с восстанавливающим концом сахарной цепи через $\alpha 1,6$ связь с N-ацетилглюкозамином («GlcNAc»). Введение анти-CD40 антитела осуществляется в дозе от 0,1 до 2000 мкг/кг (мкг антитела на килограмм массы тела пациента). В одном варианте осуществления изобретения уровень дозы составляет от 10 до 1000 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы составляет от 50 до 800 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы составляет от 75 до 600 мкг/кг. В другом варианте осуществления изобретения уровень дозы составляет от 100 до 500 мкг/кг. В других вариантах осуществления изобретения уровень дозы представляет собой

диапазон, выбранный из следующих значений: 100-300 мкг/кг, 300-500 мкг/кг, 500-700 мкг/кг, 700-900 мкг/кг и 900-1100 мкг/кг. В других вариантах осуществления изобретения уровень дозы представляет собой диапазон, выбранный из следующих значений: 100-150 мкг/кг, 150-200 мкг/кг, 200-250 мкг/кг, 250-300 мкг/кг, 300-350 мкг/кг, 350-400 мкг/кг, 400-450 мкг/кг, 450-500 мкг/кг, 500-550 мкг/кг, 550-600 мкг/кг, 600-650 мкг/кг, 650-700 мкг/кг, 700-750 мкг/кг, 750-800 мкг/кг, 800-850 мкг/кг, 850-900 мкг/кг, 900-950 мкг/кг, 950-1000 мкг/кг, 1000-1050 мкг/кг и 1050-1100 мкг/кг. В других вариантах осуществления изобретения уровень дозы выбран из следующих значений: примерно 60 мкг/кг, примерно 100 мкг/кг, примерно 150 мкг/кг, примерно 200 мкг/кг, примерно 250 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 350 мкг/кг, примерно 400 мкг/кг, примерно 450 мкг/кг, примерно 500 мкг/кг, примерно 550 мкг/кг, примерно 600 мкг/кг, примерно 650 мкг/кг, примерно 700 мкг/кг, примерно 750 мкг/кг, примерно 800 мкг/кг, примерно 850 мкг/кг, примерно 900 мкг/кг, примерно 950 мкг/кг, примерно 1000-1050 мкг/кг, примерно 1050 мкг/кг и 1110 мкг/кг.

[0006] В одном варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые три недели. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые шесть недель. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые десять недель. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые двенадцать недель. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые пятнадцать недель. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD40 антитело вводят каждые восемнадцать недель.

[0007] В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет CD40-положительный рак. В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет CD40-отрицательный рак. В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет рак, который представляет собой солидную опухоль. В еще одном варианте осуществления изобретения пациент имеет рак, который представляет собой рак крови. В другом варианте осуществления изобретения рак представляет собой меланому, рак молочной

железы, включая метастатический рак молочной железы, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, или рак поджелудочной железы.

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака путем введения пациенту комбинации анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку. Одним из примеров антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, является антитело против ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA4). Примеры анти-CTLA4 антител включают, например, ипилимумаб или тремелиумаб. Другим примером антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, является антитело против белка программируемой клеточной смерти 1 (PD1). Примеры анти-PD1 антител включают, например, ниволумаб, пидилизумаб или пемролизумаб. Еще одним примером антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, является антитело против лиганда белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1). Примеры анти-PD-L1 антител включают, например, MEDI4736 и MPDL3280A.

[0009] В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет CD40-положительный рак и получает лечение комбинацией анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, например, анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела или анти-PD-L1 антитела. В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет CD40-отрицательный рак и получает лечение комбинацией анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, например, анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела или анти-PD-L1 антитела. В другом варианте осуществления изобретения пациент имеет солидную опухоль и получает лечение комбинацией анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, например, анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела или анти-PD-L1 антитела. В еще одном варианте осуществления изобретения пациент имеет рак, который представляет собой рак крови, и получает лечение комбинацией анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, например, анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела или анти-PD-L1 антитела. В еще одном

варианте осуществления изобретения рак представляет собой меланому, рак молочной железы, включая метастатический рак молочной железы, рак легкого, включая немелкоклеточный рак легкого, или рак поджелудочной железы, и его лечение осуществляется комбинацией анти-CD40 антитела и антитела, которое блокирует иммунную контрольную точку, например, анти-CTLA4 антитела, анти-PD1 антитела или анти-PD-L1 антитела.

Определения

[0010] «Полипептид» или «полипептидная цепь» представляет собой полимер аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, полученный естественным или синтетическим путем. Полипептиды размером менее примерно 10 аминокислотных, как правило, называются «пептиды».

[0011] «Белок» представляет собой макромолекулу, содержащую одну или несколько полипептидных цепей. Белок также может содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку клеткой, в которой продуцируется белок, и они будут различаться в зависимости от типа клетки. Белки в настоящем изобретении описываются по их структуре основной аминокислотной цепи; заместители, такие как углеводные группы, как правило, не указываются, но, тем не менее, они могут присутствовать.

[0012] Термины «аминоконцевая» и «карбоксиконцевая» используются в настоящем изобретении для обозначения положений в полипептидах. В зависимости от контекста эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. На пример, определенная последовательность, имеющая карбоксиконцевое расположение в полипептиде относительно стандартной последовательности, расположена вблизи карбоксильного конца стандартной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полного полипептида.

[0013] Термин «антитело» используется в настоящем изобретении для обозначения белков иммуноглобулинов, продуцируемых организмом в ответ на присутствие антигена, и

которые связываются с антигеном, а также их антигенсвязывающих фрагментов и сконструированных вариантов. Таким образом, термин «антитело» включает, например, интактные моноклональные антитела, содержащие полноразмерные тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина (например, антитела, полученные с использованием гибридомной технологии) и антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты $F(ab')_2$ и Fab. Генно-инженерные интактные антитела и фрагменты, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела, диаитела, миниантитела, линейные антитела, поливалентные или мультиспецифичные (например, биспецифичные) гибридные антитела и тому подобное, также охватываются этим термином. Таким образом, термин «антитело» используется расширительно и включает любой белок, который содержит антигенсвязывающий сайт антитела, и который способен специфично связываться с его антигеном.

[0014] «Антигенсвязывающий сайт антитела» представляет собой часть антитела, которая является достаточной для связывания с его антигеном. Минимально, такая область, как правило, представляет собой переменный домен или его генно-инженерный вариант. Однодоменные сайты связывания могут быть получены из верблюжьих антител (см. Muyldermans and Lauwereys, J. Mol. Recogn. 12: 131-140, 1999; Nguyen et al., EMBO J. 19: 921-930, 2000) или из VH доменов других видов для получения однодоменных антител («dAbs»; см. Ward et al., Nature 341:544-546, 1989; Патент США No.6248516 авторов Winter et al.). В некоторых вариантах антигенсвязывающий сайт представляет собой область полипептида, имеющую только две определяющие комплементарность области (CDRs) природного или не природного (например, мутагенизированного) переменного домена тяжелой цепи или переменного домена легкой цепи или их комбинацию (см., например, Pessi et al., Nature 362:367-369, 1993; Qiu et al., Nature Biotechnol. 25: 921-929, 2007). В большинстве случаев антигенсвязывающий сайт антитела содержит как переменный домен тяжелой цепи (VH), так и переменный домен

легкой цепи (VL), которые связываются с общим эпитопом. В контексте настоящего изобретения антитело может включать один или несколько компонентов в дополнение к антигенсвязывающему сайту, таких как, например, второй антигенсвязывающий сайт антитела (который может связываться с тем же самым или другим эпитопом или с тем же или другим антигеном), пептидный линкер, константная область иммуноглобулина, шарнирная область иммуноглобулина, амфипатическая спираль (см. Pack and Pluckthun, *Biochem.* 31: 1579-1584, 1992), непептидный линкер, олигонуклеотид (см. Chaudri et al., *FEBS Letters* 450: 23-26, 1999), цитостатический или цитотоксический лекарственный препарат и тому подобное, и может представлять собой мономерный или мультимерный белок. Примеры молекул, содержащих антигенсвязывающий сайт антитела, известны в данной области техники и включают, например, Fv, одноцепочечный Fv (scFv), Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, диатела, dAbs, миниантитела, наноантитела, слитые Fab-scFv, биспецифичный (scFv)₄-IgG и биспецифичный (scFv)₂-Fab. (См., например, Hu et al., *Cancer Res.* 56: 3055-3061, 1996; Atwell et al., *Molecular Immunology* 33: 1301-1312, 1996; Carter and Merchant, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 449-454, 1997; Zuo et al., *Protein Engineering* 13: 361-367, 2000 и Lu et al., *J. Immunol. Methods* 267: 213-226, 2002).

[0015] Используемый здесь термин «иммуноглобулин» относится к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, в основном кодируемому геном(ами) иммуноглобулина. Одна форма иммуноглобулина составляет основную структурную единицу нативных (т.е. природных) антител у позвоночных животных. Эта форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая из этих пар имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные области легкой и тяжелой цепей (VL и VH) вместе в основном отвечают за связывание с антигеном, а константные области в основном отвечают за эффекторные функции антитела. У высших позвоночных животных было идентифицировано пять классов белков иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE). IgG представляет собой основной класс; в норме

он существует как второй наиболее распространенный белок, обнаруженный в плазме крови. У людей IgG состоит из четырех подклассов, обозначенных IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Константные области тяжелой цепи класса IgG обозначаются греческой буквой γ . Например, иммуноглобулины подкласса IgG1 содержат константную область тяжелой цепи γ_1 . Каждая тяжелая цепь иммуноглобулина обладает константной областью, которая состоит из константных областей белковых доменов (CH1, шарнирная область, CH2 и CH3; IgG3 также содержит домен CH4), которые являются по существу инвариантными для данного подкласса у вида. Последовательности ДНК, кодирующие цепи человеческих и нечеловеческих иммуноглобулинов, известны из уровня техники (см., например, Ellison et al., DNA 1: 11-18, 1981; Ellison et al., Nucleic Acids Res. 10: 4071-4079, 1982; Kenten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6661-6665, 1982; Seno et al., Nuc. Acids Res. 11:719-726, 1983; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Amster et al., Nuc. Acids Res. 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, Nature 314:330-334, 1985; Boss et al., Nuc. Acids Res. 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., Nature 298:380-382, 1982; van der Loo et al., Immunogenetics 42:333-341, 1995; Karlin et al., J. Mol. Evol. 22:195-208, 1985; Kindsvogel et al., DNA 1:335-343, 1982; Breiner et al., Gene 18:165-174, 1982; Kondo et al., Eur. J. Immunol. 23:245-249, 1993; и GenBank Accession No. J00228). Структура и функция иммуноглобулинов рассматривается в Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; and Padlan, Mol. Immunol. 31: 169-217, 1994. Термин «иммуноглобулин» используется здесь в своем общепринятом значении для обозначения интактного антитела, входящих в его состав цепей или фрагментов цепей, в зависимости от контекста.

[0016] Полноразмерные «легкие цепи» иммуноглобулина (примерно 25 кДа или 214 аминокислот) кодируются геном переменной области на аминоконце (кодирует примерно 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда на карбоксиконце. Полноразмерные «тяжелые цепи» иммуноглобулина (примерно 50 кДа или 446 аминокислот) кодируются геном

вариабельной области (кодирует примерно 116 аминокислот) и геном константной области гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (кодирует примерно 330 аминокислот), причем последние определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях переменная и константная области соединяются «J»-областью, состоящей из примерно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает «D»-область, состоящую из примерно 10 аминокислот. (Общую информацию см. в *Fundamental Immunology* (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7).

[0017] Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также обозначаемая здесь как «вариабельный домен легкой цепи» («VL домен») или «вариабельный домен тяжелой цепи» («VH домен»), соответственно) состоит из «каркасной» области, прерываемой тремя гипервариабельными областями, также именуемыми «определяющие комплементарность области» или «CDRs». Каркасные области служат для выравнивания CDR для специфического связывания с эпитопом антигена. Таким образом, термин «гипервариабельная область» или «CDR» относится к аминокислотным остаткам антитела, которые преимущественно отвечают за связывание антигена. От аминоконца до карбоксиконца оба домена VL и VH содержат следующие каркасные области (FR) и CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Обозначение аминокислот в каждом домене соответствует определениям, приведенным в *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), или в Chothia & Lesk, J. *Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989. В Kabat также предлагается широко используемая система нумерации (нумерация по Kabat), в соответствии с которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присваивается одинаковый номер. CDRs 1, 2 и 3 домена VL также обозначаются здесь, соответственно, как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDRs 1, 2 и 3 домена VH также обозначаются здесь, соответственно, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3.

[0018] Если контекст не требует иного, то используемый

здесь термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способ, которым оно получено.

[0019] Термин «химерное антитело» относится к антителу, имеющему переменные домены, полученные от первого вида и константные области, полученные от второго вида. Химерные иммуноглобулины или антитела могут быть сконструированы, например, при помощи генной инженерии из сегментов гена иммуноглобулина, принадлежащих к различным видам. Термин «гуманизированное антитело», как определено ниже, не предназначен для обозначения химерных антител. Хотя гуманизированные антитела являются химерными по своей конструкции (т.е. содержат области из более чем одного вида белка), они включают дополнительные признаки (то есть переменные области, содержащие остатки донорной CDR и остатки акцепторной каркасной области), не обнаруженные в химерных иммуноглобулинах или антителах, как определено здесь.

[0020] Термин «гуманизированный VH-домен» или «гуманизированный VL-домен» относится к домену VH или VL иммуноглобулина, содержащему некоторые или все CDRs полностью или в значительной степени из нечеловеческого донорного иммуноглобулина (например, мыши или крысы) и последовательности каркасных областей переменной области полностью или практически из последовательностей иммуноглобулина человека. Нечеловеческий иммуноглобулин, служащий источником CDRs, называется «донором», а человеческий иммуноглобулин, служащий источником каркасных областей, называется «акцептором». В некоторых случаях гуманизированные антитела могут сохранять нечеловеческие остатки в каркасных областях переменного домена человека для усиления характеристик правильного связывания (например, мутации в каркасных областях могут оказаться необходимыми для сохранения аффинности связывания при гуманизации антитела).

[0021] «Гуманизированное антитело» представляет собой

антитело, содержащее один или оба из следующих доменов: гуманизированный домен VH и гуманизированный домен VL. Константная область (и) иммуноглобулина необязательно должна присутствовать, но если они есть, то они полностью или в значительной степени представляют собой константные области иммуноглобулина человека.

[0022] Специфичное связывание антитела со своим целевым антигеном означает аффинность, по меньшей мере, 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Специфичное связывание значительно выше по величине и отличается от неспецифичного связывания, происходящего, по меньшей мере, с одной неспецифичной мишенью. Специфичное связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретного пространственного совмещения (например, по тип «ключ-замок»), в то время как неспецифичное связывание обычно является результатом ван-дер-ваальсовых сил. Специфичное связывание, однако, не обязательно означает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

[0023] Что касается описанных здесь белков, то ссылка на аминокислотные остатки, соответствующие указанным в SEQ ID NO, включает посттрансляционные модификации таких остатков.

[0024] Используемый здесь термин «разбавитель» относится к раствору, подходящему для изменения или достижения приводимой в качестве примера или подходящей концентрации или концентраций, как описано здесь.

[0025] Термин «контейнер» относится к какому-либо предмету, в который может быть помещен или содержаться объект или жидкость, например, для хранения (например, держатель, емкость, сосуд или тому подобное).

[0026] Термин «способ введения» включает известные в данной области техники пути введения для доставки терапевтического белка, такие как, например, парентеральный, внутривенный, внутримышечный или подкожный. Для введения антитела для лечения рака может быть желательным введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Для лечения рака, характеризующегося солидной опухолью, введение также может быть

локализовано непосредственно в опухоль, если это является необходимым.

[0027] Термин «лечение» относится к введению терапевтического агента пациенту, у которого имеется заболевание, с целью излечения, заживления, частичного снятия симптомов, задержки, облегчения, изменения, лечения, улучшения, способствования улучшению или воздействия на заболевание.

[0028] Термин «пациент» включает человека и других млекопитающих, которые получают или профилактическое, или терапевтическое лечение.

[0029] Термин «эффективное количество», «эффективная доза» или «эффективная дозировка» относится к количеству, которое является достаточным для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта, например, достаточным для ингибирования возникновения или улучшения одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства. Эффективное количество фармацевтической композиции вводят в «эффективном режиме». Термин «эффективный режим» относится к комбинации количества вводимой композиции и частоты дозирования, достаточной для осуществления профилактического или терапевтического лечения заболевания или расстройства.

[0030] Используемый здесь термин «примерно» обозначает приблизительный диапазон плюс или минус 10% от указанного значения. Например, формулировка «примерно 20 мкг/кг» охватывает диапазон от 18 до 22 мкг/кг. В том значении, в каком он употребляется здесь, термин «примерно» также включает точное количество. Таким образом, «примерно 20 мкг/кг» означает «примерно 20 мкг/кг», а также «20 мкг/кг».

Краткое описание чертежей

[0031] На Фигуре 1 показано связывание SEA-CD40 (сплошная линия) и дацетузумаба (пунктирная линия) для белка CD40 человека, присутствующего на поверхности МКПК.

[0032] На Фигуре 2А и 2В показана аффинность связывания SEA-CD40 (пустые и закрашенные квадраты) и дацетузумаба (пустые и закрашенные круги) для вариантов рецептора FcγIIIa человека. На

Фигуре 2А показано графическое представление, а на Фигуре 2В показаны значения K_D . Значения SEA-CD40 показаны в левой колонке; Значения дацетузумаба показаны в правой колонке.

[0033] На Фигуре 3 показана связь с дозой и временная динамика истощения В-клеток в моноклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) в результате обработки SEA-CD40.

[0034] На Фигурах 4А и 4В показан репрезентативный синтез цитокинов в цельной крови человека после обработки в течение двадцати четырех часов SEA-CD40 или изотипическим контролем (SEA-h00). Антитела вводили в единицах мкг/мл. На Фигуре 4А показан синтез фактора некроза опухолей- α , а на Фигуре 4В показан синтез MIP-1 β .

[0035] На Фигурах 5А и 5В показан репрезентативный синтез цитокинов МКПК человека после обработки в течение двадцати четырех часов SEA-CD40 или изотипическим контролем (SEA-h00). Антитела вводили в единицах мкг/мл. На Фигуре 5А показан синтез фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), а на Фигуре 5В показан синтез MIP-1 β .

[0036] На Фигуре 6 показана временная динамика истощения В-клеток в МКПК человека в результате обработки SEA-CD40 (закрашенные квадраты); дацетузумабом (серые круги) или SEA-CD40 F(ab')₂ (серые квадраты).

[0037] На Фигуре 7 показан синтез интерферона- γ (ИФН- γ) МКПК в результате обработки SEA-CD40 (закрашенные квадраты); дацетузумабом (серые круги) или SEA-CD40 F(ab')₂ (серые квадраты).

[0038] На Фигуре 8 показана индукция HLA-DR/DQ/DP в качестве маркера созревания антигенпрезентирующих клеток МКПК в результате обработки SEA-CD40 (закрашенные квадраты); дацетузумабом (серые круги) или SEA-CD40 F(ab')₂ (серые квадраты).

[0039] На Фигуре 9 показаны кривые зависимости нормализованного ответа от концентрации для маркеров иммунной активации в МКПК, обработанных различными концентрациями SEA-

CD40.

[0040] На Фигурах 10А и 10В показано сравнение иммунного ответа на пептид вируса гриппа М1 МКПК, инкубированными с SEA-CD40 или дацетузумабом. На Фигуре 10А показаны уровни антигенспецифичных Т-лимфоцитов (в процентах); На Фигуре 10В показаны уровни синтеза ИФН- γ .

[0041] На Фигуре 11 показано усиление иммунного ответа на пептид вируса гриппа М1 МКПК, инкубированными с комбинацией SEA-CD40 и или анти-CTLA-4 антитела или анти-PD-1 антитела. Уровни ИФН- γ показаны на Фигуре 11.

[0042] На Фигуре 12 показано усиление иммунного ответа на пептид вируса гриппа М1 МКПК, инкубированными с комбинацией SEA-CD40 и или анти-CTLA-4 антитела или анти-PD-1 антитела. Уровни антигенспецифичных Т-лимфоцитов показаны на Фигуре 12.

[0043] На Фигуре 13 показан иммунный ответ (синтез ИФН- γ) МКПК от доноров с раком на общие пептиды опухолевых антигенов (MAGEA1/MAGE3/NY-ESO). МКПК инкубировали в присутствии или в отсутствии возрастающих концентраций SEA-CD40 или SGN-40 в течение 5 суток.

[0044] На Фигуре 14 показан иммунный ответ (синтез ИФН- γ) МКПК от доноров с раком на общие пептиды опухолевых антигенов (MAGEA1/MAGE3/NY-ESO). МКПК инкубировали в присутствии или в отсутствии возрастающих концентраций SEA-CD40 и/или постоянной концентрации анти-CTLA-4 или анти-PD-1 блокирующего антитела.

[0045] На Фигурах 15А и 15В показано связывание фукозилированных и нефукозилированных анти-мышиный CD40 антител с мышинными рецепторами Fc γ . Рецептор Fc γ представлял собой или Fc γ RI (Фигура 15А) или Fc γ RIV (Фигура 15В).

[0046] На Фигуре 16 показана активность *in vivo* фукозилированных и нефукозилированных суррогатов анти-CD40 антител в мышинной модели меланомы B16.

[0047] На Фигуре 17 показана активность по активации В-клеток SEA-CD40, антитела 21.4.1 и гексамерного лиганда CD40. Эксперименты проводили с использованием очищенных культур В-клеток.

[0048] На Фигуре 18 показана активность по активации В-клеток SEA-CD40, антитела 21.4.1 и гексамерного лиганда CD40. Эксперименты проводили с использованием культур МКПК.

[0049] На Фигуре 19 показана активность по активации моноцитов/макрофагов SEA-CD40, антитела 21.4.1, дацетузумаба и изотипического контроля SEA.

[0050] На Фигуре 20 показан уровень индукции интерферона- γ (ИФН- γ) SEA-CD40, антителом 21.4.1, дацетузумабом и изотипическим контролем SEA.

[0051] На Фигуре 21 показан уровень индукции интерлейкина 10 (IL-10) SEA-CD40, антителом 21.4.1, дацетузумабом и изотипическим контролем SEA.

[0052] На Фигуре 22 показан уровень индукции интерферона- γ (ИФН- γ) SEA-CD40, антителом 21.4.1 или дацетузумабом. Инкубацию проводили в присутствии пептида вируса гриппа.

[0053] На Фигуре 23 показана индукция ответа специфичных по отношению к антигену гриппа Т-лимфоцитов SEA-CD40, антителом 21.4.1 или дацетузумабом.

[0054] На Фигуре 24 показаны изменения уровня IL-10 после инкубации МКПК с пептидом вируса гриппа и SEA-CD40, антителом 21.4.1 или дацетузумабом.

Подробное описание изобретения

[0055] В настоящем изобретении приводится описание активности нефукозилированного анти-CD40-антитела, SEA-CD40. SEA-CD40 представляет собой агонистическое антитело и обладает повышенным связыванием с рецепторами Fc γ III и, неожиданно, проявляет усиленную активацию сигнального пути CD40. Благодаря своей усиленной активации пути CD40, SEA-CD40 является мощным активатором иммунной системы и может применяться для лечения рака или для лечения инфекционных заболеваний, в частности хронических вирусных заболеваний, таких как гепатит С, вирус иммунодефицита человека, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус Джона Каннингема и вирус папилломы человека. Другие инфекционные заболевания включают, например, туберкулез. Усиленная активация иммунной системы позволяет вводить SEA-CD40

в низких дозах по сравнению с фукозилированным исходным антителом.

Описание и функция CD40

[0056] CD40 является членом суперсемейства рецепторов факторов некроза опухоли (ФНО). Он представляет собой одноцепочечный трансмембранный белок типа I со средней молекулярной массой 50 кДа. Его зрелая полипептидная основная часть состоит из 237 аминокислот, из которых 173 аминокислоты образуют внеклеточный домен (ВД), организованный в 4 богатых цистеином повтора, которые характерны для членов семейства рецепторов ФНО. Два потенциальных N-связанных сайта гликозилирования присутствуют в области ВД, находящейся близко к мембране, в то время как потенциальные O-связанные сайты гликозилирования отсутствуют. Трансмембранный домен, состоящий из 22 аминокислот, соединяет ВД с состоящей из 42 аминокислот цитоплазматической частью CD40. Мотивы последовательности, вовлеченные в CD40-опосредованную передачу сигнала, были идентифицированы в цитоплазматической части CD40. Эти мотивы взаимодействуют с цитоплазматическими факторами, называемыми факторами, ассоциированными с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF), запуская каскад различных последующих событий, включая активацию MAP-киназ и NFκB, которые, в свою очередь, модулируют транскрипционную активность различных генов, связанных с воспалением, выживанием и ростом. См. например, van Kooten and Banchereau, J. Leukoc. Biol. 67: 2-17 (2000); Elgueta et al., Immunol. Rev. 229: 152-172 (2009).

[0057] В системе кроветворения CD40 может быть обнаружен на В-клетках на разных стадиях дифференцировки, моноцитах, макрофагах, тромбоцитах, фолликулярных дендритных клетках, дендритных клетках (ДК), эозинофилах и активированных Т-лимфоцитах. В нормальных некроветворных тканях CD40 был обнаружен на почечных эпителиальных клетках, кератиноцитах, фибробластах синовиальной оболочки и кожного происхождения и активированном эндотелии. Растворимый вариант CD40 высвобождается из CD40-экспрессирующих клеток, возможно путем

дифференциального сплайсинга первичного транскрипта или ограниченного протеолиза с помощью металлопротеиназного $\text{FHO}\alpha$ -конвертирующего фермента. Высвобожденный CD40 потенциально может модифицировать иммунный ответ, препятствуя взаимодействию CD40/CD40L. См., например, van Kooten and Banchereau, J. *Leukoc. Biol.* 67: 2-17 (2000); Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229: 152-172 (2009).

[0058] Эндогенный лиганд для CD40 (CD40L) представляет собой мембранный гликопротеин типа II с массой 39 кДа, также известный как CD154. CD40L является членом суперсемейства FHO и экспрессируется как тример на поверхности клеток. CD40L транзистентно экспрессируется на активированных CD4+, CD8+ и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах. CD40L также обнаруживается на разных уровнях на очищенных моноцитах, активированных В-клетках, эпителиальных и сосуидистых эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках и ДК, но функциональная значимость экспрессии CD40L на этих типах клеток не была четко определена (van Kooten 2000; Elgueta 2009). Однако экспрессия CD40L на активированных тромбоцитах связана с патогенезом тромботических заболеваний. См., например, Ferroni et al., *Curr. Med. Chem.* 14: 2170-2180 (2007).

[0059] Наиболее описанной функцией взаимодействия CD40/CD40L является ее роль в контакт-зависимом взаимодействии между антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами. См., например, van Kooten and Banchereau, J. *Leukoc. Biol.* 67:2-17 (2000); Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229:152-172 (2009). Связывание CD40L на активированных Т-лимфоцитах с CD40 на антиген-активированных В-клетках не только стимулирует быстрое размножение В-клеток, но также обеспечивает необходимый для В-клеток сигнал для дифференцировки или в В-клетки памяти или плазматические клетки. Передача сигнала с участием CD40 необходима для образования зародышевых центров, в которых В-клетки подвергаются созреванию аффинности и переключению изотипов, чтобы приобрести способность продуцировать высокоаффинные антитела изотипов IgG, IgA и IgE. См., например, Kehry, J. *Immunol.* 156: 2345-2348 (1996). Таким образом,

индивиды с мутациями в локусе CD40L, которые делают невозможным функциональное взаимодействие CD40/CD40L, страдают первичным иммунодефицитным при X-связанном гипер-IgM синдроме, который характеризуется избыточным содержанием IgM в кровотоке и невозможностью продуцировать IgG, IgA и IgE. У этих пациентов наблюдаются подавленные вторичные гуморальные иммунные ответы, повышенная чувствительность к рецидивирующим пиогенным инфекциям и более высокая частота карцином и лимфом. Эксперименты с нокаутом гена у мышей с целью инактивации или локуса CD40, или локуса CD40L воспроизводят основные дефекты, наблюдаемые у пациентов с X-связанным гипер-IgM синдромом. У этих КО мышей также наблюдается нарушение антигенспецифичного прайминга Т-лимфоцитов, что указывает на то, что взаимодействие CD40L/CD40 также является критическим фактором для формирования клеточных иммунных ответов. См., например, Elgueta et al., Immunol. Rev. 229: 152-172 (2009).

[0060] Иммуно-стимулирующие эффекты связывания CD40 с CD40L или анти-CD40 *in vivo* коррелируют с иммунными ответами против сингенных опухолей. См., например, French et al., Nat. Med. 5: 548-553 (1999). Недостаточный иммунный ответ против опухолевых клеток может быть результатом комбинации факторов, таких как экспрессия иммунных молекул контрольной точки, таких как PD-1 или CTLA-4, снижение экспрессии антигенов МНС, низкая экспрессия опухолеассоциированных антигенов, соответствующих молекул адгезии или костимулирующих молекул и продуцирование опухолевыми клетками иммуносупрессивных белков, таких как ФНО β . Связывание CD40 на антигенпрезентирующих и трансформированных клетках приводит к активации белков адгезии (например, CD54), костимулирующих молекул (например, CD86) и антигенов МНС, а также к секреции воспалительных цитокинов, тем самым потенциально вызывая и/или усиливая противоопухолевый иммунный ответ, а также иммуногенность опухолевых клеток. См., например, Gajewski et al., Nat. Immunol. 14: 1014-1022 (2013).

[0061] Первичным следствием связывания CD40 является активация ДК (часто называемая лицензированием) и потенцирование

способности миелоидных и В-клеток процессировать и презентировать ассоциированные с опухолью антигены Т-лимфоцитам. Помимо непосредственной способности активировать врожденный иммунный ответ, уникальным следствием передачи сигналов через CD40 является презентирование АПК опухолевых антигенов предшественникам CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) в процессе, известном как «праймирование перекрестнореагирующим антигеном». Эта CD40-зависимая активация и дифференцировка предшественников ЦТЛ зрелыми ДК в опухолеспецифичные эффекторы ЦТЛ может усиливать клеточно-опосредованный иммунный ответ на опухолевые клетки. См., например, Kurts et al., Nat. Rev. Immunol. 10: 403-414 (2010).

[0062] Агонистические CD40-mAb, включая дацетузумаб, исходную молекулу SEA-CD40, показали обнадеживающую клиническую активность при одноагентной и комбинированной химиотерапии. Дацетузумаб продемонстрировал определенную клиническую активность в фазе 1 клинических испытаний при НХЛ и в фазе 2 клинических испытаний при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (ДКВЛ). См., например, Advani et al., J. Clin. Oncol. 27: 4371-4377 (2009) и De Vos et al., J. Hematol. Oncol. 7: 1-9 (2014). Кроме того, CP-870,893, гуманизированное IgG2-агонистическое антитело к CD40, показало обнадеживающую активность при лечении солидной опухоли в комбинации с паклитакселом или карбоплатином или гемцитабином. В этих исследованиях были обнаружены активация антигенпрезентирующих клеток, продуцирование цитокинов и образование антигенспецифичных Т-лимфоцитов. См., например, Beatty et al., Clin. Cancer Res. 19: 6286-6295 (2013) и Vonderheide et al., Oncoimmunology 2: e23033 (2013).

Анти-CD40 антитела

[0063] Принимая во внимание его роль в иммунной функции, против антигена CD40 были получены антитела. Такие антитела можно разделить на три группы, антагонистические антитела, которые ингибируют активность CD40; частично агонистические антитела, которые частично индуцируют активность CD40; и полностью агонистические антитела, которые полностью стимулируют

активность CD40. Члены каждой из этих групп были протестированы в клинических испытаниях; и в настоящее время ни один из них не был рекомендован к применению.

SEA-CD40

[0064] Настоящее изобретение относится к нефукозилированному антителу hS2C6, SEA-CD40. S2C6 первоначально было получено в виде мышинного моноклонального антитела, полученного против карциномы мочевого пузыря человека, обозначаемого здесь как mS2C6. См., например, Paulie et al., Cancer Immunol. Immunother. 17: 165-179 (1984). Антитело S2C6 является частичным агонистом сигнального пути CD40 и, следовательно, обладает следующими активностями: связывание с белком CD40 человека, связывание с белком CD40 макака-крабоеда, активация сигнального пути CD40, потенцирование взаимодействия CD40 с его лигандом, CD40L. См., например, Патент США No.6946129.

[0065] На следующем этапе разработки S2C6 было гуманизировано, и это гуманизированное антитело здесь обозначается как гуманизированное антитело S2C6, и альтернативно как дацетизумаб или фукозилированное гуманизированное антитело S2C6 (fhS2C6) или SGN-40. См., например, Международную патентную заявку WO2006/128103. SGN-40 было протестировано в клинических испытаниях на людях и показало свою недостаточную активность, что сделало дальнейшую работу с ним нецелесообразным.

[0066] SEA-CD40 представляет собой нефукозилированное гуманизированное антитело S2C6. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи для SEA-CD40 раскрыты в SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно. Варибельная область тяжелой цепи представляет собой аминокислоты 1-113 в SEQ ID NO: 1; варибельная область легкой цепи представляет собой аминокислоты 1-113 в SEQ ID NO: 2. Получение основы антитела SEA-CD40 раскрыто в Международной патентной заявке WO2006/128103, которая включена в настоящее изобретение путем ссылки.

[0067] Настоящее изобретение относится к нефукозилированному гуманизированному антителу S2C6, обозначаемое здесь как nf hS2C6 или SEA-CD40. Кроме повышенного

связывания с Fc-рецепторами, SEA-CD40 также повышает активность пути CD40 по сравнению с исходным антителом дацетизумаб. Таким образом, антитело SEA-CD40 вводят пациентам в более низких дозах и с использованием других схем введения.

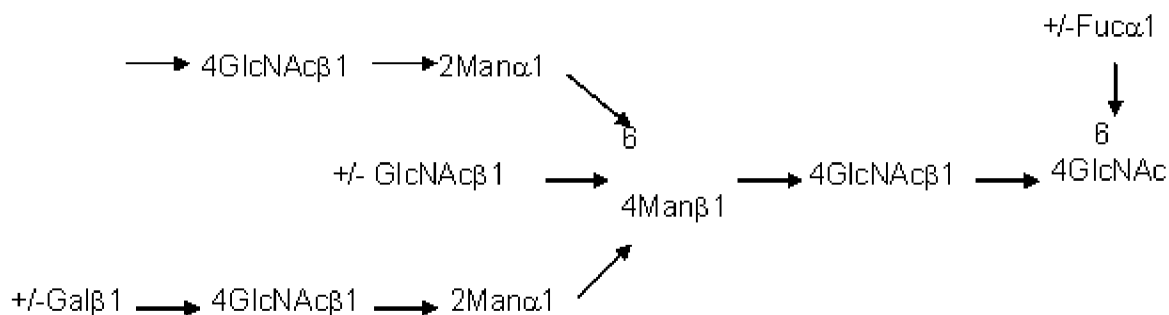
Нефукозилированные антитела

[0068] SEA-CD40 представляет собой нефукозилированное антитело и обладает повышенным связыванием с FcγIII-рецепторами и неожиданно повышает способность активировать сигнальный путь CD40 в иммунных клетках.

Способы получения нефукозилированных антител

[0069] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения гуманизированных антител S2C6 с уменьшенным фукозилированием основы. Используемый здесь термин «фукозилирование основы» относится к добавлению фукозы («фукозилирование») к N-ацетилглюкозамину («GlcNAc») на восстанавливающем конце N-связанного гликана.

[0070] Фукозилирование сложных связанных с N-гликозидом сахарных цепей, связанных с Fc-областью (или доменом) основной цепи антитела SEA-CD40, снижается. Используемый здесь термин «сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь» обычно связан с аспарагином 297 (в соответствии с индексом EU, как описано в Kabat, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, MD, 1991). Используемая здесь сложная цепь, связанная с N-гликозидом, имеет биантеннарную композитную сахарную цепь, в основном имеющую следующую структуру:



где указывает на то, что молекула сахара может присутствовать или отсутствовать, а числа указывают на положение связей между молекулами сахара. В вышеприведенной структуре

конец сахарной цепи, который связывается с аспарагином, называется восстанавливающим концом (справа), а противоположная сторона называется невосстанавливающим концом. Фукоза как правило связана с N-ацетилглюкозамином («GlcNAc») восстанавливающего конца, как правило, связью $\alpha 1,6$ (6-положение GlcNAc связано с 1-положением фукозы). «Gal» относится к галактозе, а «Man» относится к маннозе.

[0071] «Сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь» включает 1) сложный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона основной структуры имеет одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемого «Gal-GlcNAc»), и невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, делящую пополам N-ацетилглюкозамин или тому подобное; или 2) гибридный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона основной структуры имеет обе ветви связанной с N-гликозидом сахарной цепи высоким содержанием маннозы и сложной связанной с N-гликозидом сахарной цепи.

[0072] В некоторых вариантах осуществления изобретения «сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь» включает сложный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона основной структуры имеет ноль, одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемого «gal-GlcNAc»), и невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет такую структуру, как сиаловая кислота, делящую пополам N-ацетилглюкозамин или тому подобное.

[0073] В соответствии с настоящим способом, обычно только незначительное количество фукозы вводится в сложную связанную с N-гликозидом цепь (цепи) молекулы SEA-CD40. Например, в различных вариантах осуществления изобретения менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20%, менее примерно 15%, менее примерно 10%, менее примерно 5%, или менее примерно 3% антитела имеет фукозилированную фукозой основу. В некоторых вариантах осуществления изобретения примерно 2% антитела имеет

фукозилированную фукозой основу.

[0074] В некоторых вариантах осуществления изобретения только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита или продукта аналога фукозы) вводится в сложную связанную с N-гликозидом цепь (цепи). Например, в различных вариантах осуществления изобретения менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20%, менее примерно 15%, менее примерно 10%, менее примерно 5% или менее примерно 3% антитела SEA-CD40 имеет основу, фукозилированную аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения примерно 2% антитела SEA-CD40 имеет основу, фукозилированную аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы.

[0075] Способы получения нефукозилированных антител путем инкубации продуцирующих антитело клеток с аналогом фукозы описаны, например, в Международной патентной заявке WO2009/135181. В кратком изложении, клетки, которые были сконструированы для экспрессии гуманизированного антитела S2C6, инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Используемый здесь внутриклеточный метаболит может представлять собой, например, ГДФ-модифицированный аналог или полностью или частично деэтерифицированный аналог. Продукт может представлять собой, например, полностью или частично деэтерифицированный аналог. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в пути утилизации фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или ГДФ-фукозопирофосфорилазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например белок FUT8). В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента в пути синтеза фукозы *de novo*. Например, аналог фукозы (или

внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность 4,6-дегидратазы ГДФ-маннозы и/или ГДФ-фукозосинтетазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать транспортер фукозы (например, транспортер ГДФ-фукозы).

[0076] В одном варианте осуществления изобретения аналог фукозы представляет собой 2-фторфукозу. Способы применения аналогов фукозы в питательной среде и другие аналоги фукозы раскрыты, например, в Международной патентной заявке WO2009/135181, которая включена в настоящее изобретение путем ссылки.

[0077] Другие способы конструирования клеточных линий для уменьшения фукозилирования основы включают нокаут генов, активацию генов и РНК интерференцию (РНКи). При нокауте генов ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа 1,6-фукозилтрансфераза), подвергается инактивации. FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка от ГДФ-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. Сообщается, что FUT8 является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы к N-связанному биантеннарному углеводу при Asn297. При активации генов добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или Гольджи альфа-маннозидаза II. Повышение уровней таких ферментов в клетках отвлекает моноклональные антитела от пути фукозилирования (приводя к уменьшению фукозилирования основы) и увеличивая количество бисектирующих N-ацетилглюкозаминов. РНКи также обычно нацелена на экспрессию гена FUT8, и приводит к снижению уровню транскрипции мРНК или полному нокауту экспрессии гена. Любой из этих способов можно использовать для получения клеточной линии, которая могла бы продуцировать нефукозилированное антитело, например, антитело SEA-CD40.

[0078] Специалистам в данной области техники известно, что существует множество способов определения степени фукозилирования антитела. Эти способы включают, например, ЖХ-МС при помощи PLRP-S хроматографии, и времяпролетную квадрупольную МС с ионизацией электрораспылением.

[0079] Нефукозилированное антитело SEA-CD40 при введении пациенту индуцирует активацию созревания моноцитов в макрофаги и индуцирует синтез цитокинов, включая, например, интерферон- γ (ИФН- γ), и хемокинов, которые вызывают устойчивую Т-клеточный ответ на стимуляцию иммунной системы антигеном. В отличие от полностью агонистических антител, таких как антитело 24.4.1., SEA-CD40 не индуцирует синтез иммунодемпфирующих цитокинов, таких как интерлейкин-10 (IL-10). ИЛ-10, в свою очередь, индуцирует активность регуляторных Т-лимфоцитов, которые ослабляют иммунную реакцию. Таким образом, SEA-CD40 пригоден для индукции устойчивого иммунного ответа, опосредованного Т-лимфоцитами, без стимулирования активности регуляторных Т-лимфоцитов.

Дозы и введение SEA-CD40

[0080] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и практически изотоническими, и изготавливаются в условиях НПП. Фармацевтические композиции могут быть получены в стандартной лекарственной форме (то есть дозировке для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Состав композиции зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела могут находиться в составе водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, антитела могут находиться в лиофилизованной форме для восстановления перед использованием подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой.

[0081] SEA-CD40 вводят внутривенно. В других вариантах осуществления изобретения SEA-CD40 вводят подкожно. В другом варианте осуществления изобретения SEA-CD40 вводят подкожно в область опухоли.

[0082] Нефукозилированное SEA-CD40-антитело неожиданно обладает повышенной иммуноактивационной способностью по сравнению со своим исходным антителом дацетизумабом. Таким образом, SEA-CD40 может вводиться пациентам в более низких дозах и по другим схемам введения по сравнению с дацетизумабом.

[0083] В качестве примера, SEA-CD40 может вводиться пациентам в дозе от 0,1 до 2000 мкг/кг (мкг антитела на килограмм массы тела пациента). Другие возможные диапазоны доз составляют 10-1000 мкг/кг, 50-800 мкг/кг, 75-600 мкг/кг, 100-500 мкг/кг. Другие возможные диапазоны доз составляют 100-300 мкг/кг, 300-500 мкг/кг, 500-700 мкг/кг, 700-900 мкг/кг и 900-1100 мкг/кг. Дополнительные диапазоны доз составляют 100-150 мкг/кг, 150-200 мкг/кг, 200-250 мкг/кг, 250-300 мкг/кг, 300-350 мкг/кг, 350-400 мкг/кг, 400-450 мкг/кг, 450-500 мкг/кг, 500-550 мкг/кг, 550-600 мкг/кг, 600-650 мкг/кг, 650-700 мкг/кг, 700-750 мкг/кг, 750-800 мкг/кг, 800-850 мкг/кг, 850-900 мкг/кг, 900-950 мкг/кг, 950-1000 мкг/кг, 1000-1050 мкг/кг и 1050-1100 мкг/кг. Другие возможные диапазоны доз составляют 0,3-200 мкг/кг, 0,6-150 мкг/кг, 1,0-100 мкг/кг, 2-50 мкг/кг, 5-25 мкг/кг, 7,5-15 мкг/кг и 8-12 мкг/кг.

[0084] В других вариантах осуществления изобретения SEA-CD40 вводят пациентам в количестве 0,6 мкг/кг, 1,0 мкг/кг, 2,5 мкг/кг, 5,0 мкг/кг, 7,5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 30 мкг/кг, 50 мкг/кг, 75 мкг/кг, 100 мкг/кг или 200 мкг/кг. В предпочтительном варианте осуществления изобретения SEA-CD40 вводят пациентам в количестве 10 мкг/кг.

[0085] В других вариантах осуществления изобретения SEA-CD40 вводят пациентам в количестве примерно 60 мкг/кг, примерно 100 мкг/кг, примерно 150 мкг/кг, примерно 200 мкг/кг, примерно 250 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 350 мкг/кг, примерно 400 мкг/кг, примерно 450 мкг/кг, примерно 500 мкг/кг, примерно 550 мкг/кг, примерно 600 мкг/кг, примерно 650 мкг/кг, примерно 700 мкг/кг, примерно 750 мкг/кг, примерно 800 мкг/кг, примерно 850 мкг/кг, примерно 900 мкг/кг, примерно 950 мкг/кг, примерно 1000-1050 мкг/кг, примерно 1050 мкг/кг и 1110 мкг/кг.

[0086] В некоторых вариантах осуществления изобретения SEA-

CD40 вводят таким образом, чтобы уменьшить вероятность иммунного истощения. Например, SEA-CD40 может вводиться с трехнедельными интервалами, шестинедельными интервалами, восьминедельными интервалами, десятинедельными интервалами, двенадцатинедельными интервалами или четырнадцатинедельными интервалами. Интервалы могут также составляться по месячному графику, например, через один месяц, два месяца или три месяца.

[0087] Поскольку SEA-CD40 активизирует иммунную систему для ответа на связанные с опухолью антигены, его применение не ограничено раковыми клетками, которые экспрессируют CD40. Таким образом, SEA-CD40 может применяться для лечения как CD40-положительного, так и CD40-отрицательного рака.

[0088] SEA-CD40 предпочтительно применяют для лечения опухолей, о которых известно, что они обладают иммунной реактивностью, особенно если рак экспрессирует низкие уровни CD40 или не обнаруживает экспрессию CD40. К иммунореактивным видам рака относятся, например, меланома; рак мочевого пузыря; рак легких, например мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого; рак яичника; рак почки; рак поджелудочной железы; рак молочной железы; рак шейки матки; рак головы и шеи, рак предстательной железы; глиобластома; неходжкинская лимфома; хронический лимфолейкоз; гепатоцеллюлярная карцинома; или множественная миелома.

[0089] В другом варианте осуществления изобретения SEA-CD40 применяют для лечения солидных опухолей. В другом варианте осуществления изобретения SEA-CD40 применяют для лечения рака крови, например лимфомы, включая неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина; хронического лимфолейкоза; или множественной миеломы.

Комбинированная терапия SEA-CD40

[0090] Благодаря своей иммуностимулирующей функции, SEA-CD40 может применяться в комбинации с другими терапевтическими агентами, которые активируют иммунную систему. Препараты, обладающие иммуностимулирующей функцией, включают, например, модуляторы Т-лимфоцитов, в том числе ингибиторы иммунной контрольной точки; иммунные активаторы; и химиотерапевтические агенты, которые индуцируют иммуногенную гибель клеток. В

качестве примера, некоторые антитела функционируют путем блокирования активности молекул, которые служат в качестве иммунных контрольных точек на Т-лимфоцитах. Таким образом, SEA-CD40 можно использовать в комбинации с антителами, действие которых направлено на белки иммунных контрольных точек.

Модуляторы Т-лимфоцитов

[0091] Т-лимфоциты играют определенную роль в способности иммунной системы распознавать и устранять раковые образования из организма. Модуляторы Т-лимфоцитов включают антитела, которые блокируют функцию иммунных контрольных точек. См., например, Pardoll, *Nature Rev. Cancer*, 12: 252-264 (2012). Антитела, которые блокируют иммунные контрольные точки, включают, например, анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-CTLA4 антитела. Другие ингибиторы/активаторы контрольных точек включают LAG3 и TIM3. Антитела против некоторых белков могут использоваться для модуляции активности Т-лимфоцитов или предпочтительно активировать активность Т-лимфоцитов, например, антитела против 41BB, CD27, ICOS и OX40. Другие модуляторы Т-лимфоцитов включают ингибиторы фермента индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО).

[0092] Анти-CTLA4-антитела распознают ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4), также известный как кластер дифференцировки 152 или CD152. Белок CTLA-4 экспрессируется на Т-лимфоцитах, которые распознают антигены, подходящие для атаки иммунной системой. Активация CTLA-4 подавляет иммунный ответ. См., например, Nirschi and Drake, *Clin. Cancer Res.*, 19: 4917-4924 (2013). Антитела, специфичные по отношению к CTLA-4 и блокирующие его активность, применяются для лечения рака путем активации иммунного ответа на раковые заболевания. Примеры анти-CTLA-4 антител включают ипилимумаб или тремелиумаб. SEA-CD40 может вводиться в комбинации с ипилимумабом или тремелиумабом для лечения рака.

[0093] Анти-PD1 антитела распознают белок программируемой клеточной смерти 1 (PD-1). Как и CTLA-4, PD-1 экспрессируется на Т-лимфоцитах и ослабляет иммунный ответ. См., например, Nirschi and Drake, *Clin. Cancer Res.*, 19: 4917-4924 (2013). Антитела,

специфичные по отношению к PD-1 и блокирующие его активность, применяются для лечения рака путем активации иммунного ответа на раковые заболевания. Примеры анти-PD-1 антител включают MEDI0680, AMP-224, ниволумаб, пембролизумаб и пидилизумаб. Другие связывающие PD-1 белки, которые действуют как ингибиторы контрольной точки и могут использоваться в комбинации с SEA-CD40, включают, например, B7-DC-Fc. SEA-CD40 может вводиться в комбинации с MEDI0680, AMP-224, ниволумабом, пембролизумабом или пидилизумабом для лечения рака.

[0094] PD-L1 представляет собой лиганд белка PD-1. PD-L1 экспрессируется на раковых клетках, и его взаимодействие с PD-1 позволяет экспрессирующим PD-L1 раковым клеткам избегать распознавания иммунной системой. Анти-PD-L1-антитела были получены и использованы для лечения рака. Примеры анти-PD-L1 антител включают, например, MEDI4736, BMS-936559/MDX-1105, MSB0010718C и MPDL3280A. SEA-CD40 может вводиться в комбинации с MEDI4736, BMS-936559/MDX-1105, MSB0010718C или MPDL3280A для лечения рака.

[0095] Другие антитела, которые блокируют функцию белков иммунных контрольных точек, включают антитела, направленные против, например, LAG3 и TIM3, и могут применяться в комбинации с SEA-CD40.

[0096] Антитела против 41BB, CD27, ICOS и OX40 применяются для активации активности Т-лимфоцитов и могут использоваться в комбинации с SEA-CD40. Анти-OX40 антитела включают, например, MEDI6469 и MEDI6383. Примером агонистического анти-CD27-антитела является CDX-1127, которое может применяться в комбинации с SEA-CD40.

[0097] Фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) катализирует расщепление аминокислоты триптофана. Ингибиторами ИДО могут быть малые молекулы, такие как розмариновая кислота, ингибиторы COX-2 и альфа-метилтриптофан.

Химиотерапевтические агенты, которые индуцируют иммуногенную гибель клеток

[0098] У большинства людей миллионы клеток погибают посредством апоптоза и удаляются, не вызывая иммунного ответа.

Тем не менее, после лечения некоторыми химиотерапевтическими агентами наблюдаются иммунные клетки, которые проникают в опухоли. Таким образом, некоторые опухолевые клетки, убитые химиотерапевтическими агентами, действуют как вакцины и вызывают специфический к опухоли иммунный ответ. Это явление получило название иммуногенной гибели клеток (ИГК). См., например, Kroemer et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 31: 51-72 (2013). Возможность химиотерапевтического агента индуцировать ИГК может быть определена экспериментально. Должны соблюдаться два критерия. Во-первых, инъекция иммунокомпетентной мыши раковых клеток, которые были обработаны *in vitro* химиотерапевтическим агентом, должна вызывать защитный иммунный ответ, специфичный для опухолевых антигенов, в отсутствие адъюванта. Во-вторых, ИГК, происходящая *in vivo*, например, сингенная мышинная модель, получавшая лечение с использованием потенциального индуцирующего ИГК химиотерапевтического агента, должна демонстрировать иммунный ответ в опухоли, который зависит от иммунной системы.

[0099] Химиотерапевтические агенты, которые индуцируют ИГК, включают, например, антрациклины, анти-EGFR антитела, бортезомиб, циклофосфамид, гемцитабин, облучение опухоли и оксалиплатин. SEA-CD40 может применяться в комбинации с любым из этих агентов для получения усиленного иммунного ответа и лечения рака у пациента.

Иммунная активация

[0100] Рак также лечат путем введением агентов, которые непосредственно стимулируют иммунную систему. Такие агенты включают, например, агонисты ГМКСФ, ИФН-гамма, интерлейкина-2, GVAX и TLR9. Другие иммунные активаторы включают, например, противораковые вакцины, Бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ), неспецифические иммуностимуляторы (например, имиквимод) и клеточные терапии, такие как CAR-T-лимфоциты. SEA-CD40 может применяться в комбинации с любым из этих агентов для получения усиленного иммунного ответа и лечения рака у пациента.

Другие комбинации

[0101] Другие комбинации с SEA-CD40 могут применяться для лечения рака. Примеры включают, например, SEA-CD40 в комбинации

с анти-PD1 антителом, например, ниволумабом, пембролизумабом и пидилизумабом, MEDI0680 или AMP-224; SEA-CD40 в комбинации с гемцитабином, с или без паклитаксела или цисплатина или оксалиплатина; SEA-CD40 в комбинации с ингибитором BRAF, например, вемурафенибом или дабрафенибом; или SEA-CD40 в комбинации с циклофосфамидом, адриамицином, винкристином и преднизолоном (CHOP) или ритуксимабом, ифосфамидом, карбоплатином и этопозидом (RICE) или ритуксимабом, гемцитабином, дексаметазоном и цисплатином (RGDP).

Примеры

Следующие примеры приводятся в целях иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1. Синтез нефукозилированного антитела hS2C6

[0102] Гуманизированное анти-CD40-антитело S2C6 с тяжелыми и легкими цепями, представленными в SEQ ID NO: 1 и 2, экспрессировали в клетках CHO. Ингибитор фукозилирования, 2-фторфукоза, был включен в среду для культивирования клеток во время продуцирования антител, для получения нефукозилированного антитела SEA-CD40. См., например, Okeley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 110: 5404-55409 (2013). Основная среда для роста клеток не содержала фукозу, и 2-фторфукозу добавляли в среду для ингибирования фукозилирования белка. (См., там же). Включение фукозы в антитела измеряли с помощью ЖХ-МС при помощи PLRP-S хроматографии, и времяпролетной квадрупольной МС с ионизацией электрораспылением. (См., там же). Данные не показаны.

Пример 2. Характеристика нефукозилированного антитела hS2C6

[0103] **Определение аффинности связывания с CD40 SEA-CD40:** для выделения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) цельную кровь человека получали от Astarte Biologics. В кратком изложении, кровь собирали в пробирки с гепарином и доставляли в лабораторию Seattle Genetics в течение четырех часов после отбора. По прибытии кровь распределяли по 50 мл коническим пробиркам (Falcon) и центрифугировали при 200g на центрифуге Eppendorf 5810R (ротор A-4-62) в течение 20 минут при температуре 25°C без перерыва для отделения обогащенной

тромбоцитами фракции. После центрифугирования образовывались три различных слоя: нижний слой, эритроциты (составляющие 50–80% от общего объема); средний слой, очень тонкая полоска лейкоцитов; верхний слой, соломенного цвета тромбоцитарно обогащенная плазма (ТОП).

[0104] Верхний слой соломенного цвета, который обогащен тромбоцитами, отбирали при помощи 1 мл пипетки. После отбора тромбоцитарно обогащенной плазмы кровь разбавляли равными объемами стерильного ФСБ (Gibco, лот 1618435, exp 2016-07). 15 мл среды Histopaque-1077 (Sigma, номер партии RNBD2965, Expt 5/2017) нагревали до комнатной температуры и вносили под слой крови. Образцы Histopaque центрифугировали при 1500 об/мин в течение 25 минут при температуре 25°C без перерыва. После центрифугирования снова получали три слоя: нижний слой, эритроциты (50–80% от общего объема); средний слой, толстый слой лейкоцитов (также называемый «лейкоцитарная пленка»); верхний слой, ФСБ и оставшиеся тромбоциты.

[0105] Верхний слой ФСБ/тромбоцит отбирали 1 мл пипеткой и удаляли. Толстый слой лейкоцитов осторожно отбирали и помещали в чистую 50-мл стерильную коническую пробирку. Пробирки заполняли до 50 мл и клетки центрифугировали при 800 g в течение 10 минут. Промывочный раствор удаляли и осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса эритроцитов АСК (Gibco, лот 1618488) в течение десяти минут. Затем в 50 мл конические пробирки вносили 35 мл стерильного ФСБ и клетки центрифугировали при 800 g в течение 10 минут. Промывочный раствор удаляли и осадок ресуспендировали в 50 мл ФСБ. Отбирали 500 мкл образца и подсчитывали количество МКПК при помощи Vi-cell-XR (Beckman Coulter). Клетки снова центрифугировали при 800 g в течение десяти минут. Промывочный раствор удаляли и осадок ресуспендировали при 1×10^6 /мл в окрашивающем растворе FACS (BD). 100 мкл ресуспендированных МКПК наносили в 96-луночный планшет с U-образным дном (Corning) и помещали на лед. Чтобы блокировать неспецифическое связывание Fc γ RIIIa, МКПК предварительно обрабатывали 100 мкг/мл человеческих Fc-фрагментов (Calbiochem) в течение тридцати

минут. Десятикратные серийные разведения биотинилированного SEA-h00 (нефукозилированного контрольного антитела), SEA-CD40 или SGN-40 готовили для получения серии разведений (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 мкг/мл).

[0106] Образцы дважды промывали ледяным буфером FACS и инкубировали с насыщающими концентрациями ПЭ-стрептавидина (BD) на льду в течение тридцати минут. Образцы дважды промывали в ледяным буфером FACS и ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS. Связывание оценивали с использованием программного обеспечения BD LSRII и DIVA. Результаты клеточной сортировки с активацией флуоресценции анализировали в FlowJo и GeoMean, определяли флуоресценцию положительно окрашенных клеток и наносили на график в Pad Prism Graph Pad. Данные аппроксимировали при помощи нелинейной регрессии, предполагая наличие одного сайта связывания в программе Prism и значения KD связывания рассчитывали путем деления вычисленной концентрации мкг/мл на молекулярную массу SEA-CD40.

[0107] **Результаты:** Аффинность связывания SEA-CD40 и исходного антитела дацетузумаб с CD40 на моноклеарных клетках периферической крови человека (МКПК) определяли при помощи проточной цитометрии. Фоновое связывание соответствующего изотипического контроля вычитали и строили график зависимости средней интенсивности флуоресценции (СИФ) от концентрации антител. Результаты показаны на Фигуре 1. SEA-CD40 и исходное антитело дацетузумаб дали практически перекрывающиеся кривые связывания, и оба эти антитела насыщали МКПК в концентрациях приблизительно 1,17 нМ. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения фукозилирования не влияют на сродство SEA-CD40 к CD40.

[0108] **Определение аффинности связывания SEA-CD40 с FcγRIIIa:** Получали клетки CHO, которые экспрессируют высоко- (158V) или низкоаффинный (158F) вариант FcγRIIIa человека. 20×10^6 клеток центрифугировали, промывали один раз в 20 мл 1× ФСБ и ресуспендировали в 8 мл буфера для окрашивания BD. Клетки делили на аликвоты в следующей плотности: $2,0 \times 10^6$ клеток/мл в 100 мкл объема. По $0,12 \times 10^6$ клеток помещали в каждую лунку. Клетки

центрифугировали при 1250 об/мин в течение пяти минут при комнатной температуре.

Антитела разбавляли или до 0,14 мкг/мл (SGN) или до 0,04 мкг/мл (SEA). Разведения приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Биотинилированны е антитела Разведения	Конц. мг/мл	Объем антитела (мкл)	Объем буфера для окрашивания	Самая высокая конц. Красителя мкг/мл
SGN-40-Биотин	3,29	18,23	581,7	100
SEA40-Биотин	3,27	15,11	584,7	100
h00-SGN-Биотин	1,55	38,7	561,0	100
h00-SEA-Биотин	3,61	16,6	583	100

Супернатанты отбирали от отцентрифугированных клеток, и многоканальной пипеткой добавляли 60 мкл соответствующих разведений антител. Соответствующие концентрации были 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41, 0,14 мкг/мл. Образцы инкубировали при температуре 4°C в течение 1 часа. Образцы центрифугировали и дважды промывали 200 мкл окрашивающего буфера BD на лунку. Один миллилитр ПЭ-стрептавидина добавляли в 20 мл окрашивающего буфера BD (избыток 2°) для получения стрептавидинового буфера. К каждому образцу добавляли 100 мкл стрептавидинового буфера и инкубировали их в течение 30 мин в темноте при температуре 4°C. Образцы затем центрифугировали и дважды промывали 200 мкл окрашивающего буфера BD на лунку. Образцы анализировали при помощи проточной цитометрии в режиме HTS на LSRII, и график СИФ для вычисления Kd строили в программе Prism.

[0109] **Результаты:** Оценивали связывание SEA-CD40 и исходного антитела дацетизумаб с клетками яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующими низко- (158F) или высоко- (158B) аффинную форму FcγRIIIa. Результаты показаны на Фигурах 2А и 2В. SEA-CD40 связывался как с низко- (158F), так и с высокоаффинной (158 В) формой FcγRIIIa с аналогичной аффинностью (KD 27,5 нМ и 5,2 нМ, соответственно). Связывание SEA-CD40 с низкоаффинной

формой (158F) было значительно лучше, чем у фукозилированного исходного антитела дацетизумаб (KD 302,7 нМ), и SEA-CD40 даже с высокоаффинной формой 158V связывалось лучше, чем фукозилированное исходное антитело дацетизумаб (5,2 нМ и 37,9 нМ соответственно).

[0110] **Опосредованная SEA-CD40 АЗКЦ Активность:** МКПК человека выделяли, как описано выше, и обрабатывали различными концентрациями SEA-CD40 или изотипическим контролем SEA (SEA-h00) в течение 6, 24 или 48 часов. Культуры окрашивали для CD19+ В-клеток, и количество клеток определяли количественно при помощи проточной цитометрии.

[0111] **Результаты:** Культуры PBMC человека обрабатывали 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,0001 мкг/мл SEA-CD40 или не связывающимся изотипическим контролем SEA (SEA-h00) в течение 6, 24, и 48 часов и затем оценивали количество CD40-положительных клеток. Результаты показаны на Фигуре 4. Обработка SEA-CD40 приводила к значительному снижению CD40+ CD19+ В-клеток в зависимости от дозы и времени даже до низких концентраций ниже мкг/мл. Не наблюдалось существенного влияния SEA-CD40 на количество моноцитов/ДК (данные для моноцитов/ДК не приводятся).

[0112] **Оценка синтеза цитокинов в цельной крови человека или МКПК:** Цельную кровь человека получали от Astarte Biologics. В кратком изложении, 100 мл кровь собирали в пробирки с гепарином и доставляли в лабораторию Seattle Genetics в течение четырех часов после отбора. Половину крови отбирали для культур цельной крови, а другую половину использовали для выделения МКПК, как описано выше. Аликвоты по 100 мкл цельной крови наносили на а 3-96 плоскодонные планшеты для культивирования тканей (Costar). Выделенные МКПК подсчитывали в Viacell и ресуспендировали в количестве 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM, содержащей 10% ФБС (Atlanta Biologics), 1× пенициллин/стрептавидин и X глутамин (среда МКПК). Для МКПК 100 мкл ресуспендированных очищенных МКПК разделяли на аликвоты в 3-96 плоскодонные планшеты для культивирования тканей. 10× серийные разведения SEA-h00 и SEA-CD40 проводили в среде МКПК, и цельная

кровь и выделенные культуры МКПК обрабатывают убывающими концентрациями SEA-h00 или SEA-CD40 (100, 10, 1,0, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 или 0 мкг/мл). Обработка SEA-CD40 была выполнена в двух повторностях как для цельной крови, так и для МКПК культур в каждый момент времени. В каждый из заранее определенных периодов времени (6, 24 и 48 часов) 96-луночный планшет, содержащий цельную кровь или очищенные МКПК, центрифугировали с адаптером для планшета в центрифуге Eppendorf 5810R при 800 об/мин в течение 5 минут. Супернатанты культуры сыворотки или ткани удаляли и переносили в 96-луночный штатив, и образцы замораживали при -80°C до дальнейшей обработки.

[0113] Замороженные супернатанты культуры ткани и сыворотку оттаивали в течение ночи при температуре 4°C и обрабатывают для получения цитокинов с использованием мультиплексного набора реагентов Luminex от Millipore. Наборы реагентов были разработаны под заказ для анализа ИФН γ , IL-12p40, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , IL-1 β , MIP-1 β , ФНО- α , sCD40L. Анализируемые цитокины отбирали из цитокинов, наблюдаемых с дацетуземабом в предыдущих исследованиях. Супернатанты культуры ткани и образцы сыворотки обрабатывали в соответствии с инструкциям производителя. В кратком изложении, аналитические планшеты промывали 200 мкл промывочного буфера на лунку с последующим добавлением 25 мкл стандарта или буфера, 25 мкл матрицы или образца и 25 мкл мультиплексированных гранул аналита в каждую лунку. Образцы инкубировали в течение ночи при интенсивном встряхивании при температуре 4°C . Аналитические планшеты дважды промывали промывочным буфером. В каждую лунку добавляли 25 мкл детектирующих антител и инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа. Добавляли 25 мкл стрептавидин-фикоэритрина (SA-PE) и образцы инкубировали при комнатной температуре в течение тридцати минут. Планшет дважды промывали промывочным буфером и гранулы ресуспендировали в 150 мкл проточной жидкости. Образцы анализировали с использованием систем Luminex MagPix в сочетании с программной системой Xponent. Уровни цитокинов рассчитывали по стандартной кривой.

[0114] **Результаты:** культуры цельной крови человека обрабатывали изотипическим контролем SEA или SEA-CD40 (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,0001 мкг/мл) в течение 6, 24 или 48 часов. Сыворотку или супернатанты культуры ткани собирали и воспалительные цитокины оценивали с помощью мультиплексного анализа Luminex. Данные представлены в виде кратного увеличения синтеза цитокинов по сравнению с изотипическим контролем SEA. SEA-CD40 стимулировало активный синтез ИФН γ , MIP1 β и ФНО α в 6, 24 и 48 часов в цельной крови, как показано ниже в Таблице 2. Уровни SEA-CD40 представлены в крайних левых столбцах. Активность наблюдалась при таких низких уровнях, как 0,010 мкг/мл SEA-CD40. Стимуляция MIP1 β и ФНО α в 24 часа показана на Фигурах 4А и 4В.

Таблица 2

Цельная кровь

6 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100,00	4,52	2,01	2,75	1,30	30,86	3,22
10,00	10,81	1,05	2,33	1,04	26,69	1,90
1,00	4,99	1,13	1,62	0,93	4,59	2,20
0,10	3,42	0,84	0,96	1,02	0,88	1,65
0,01	1,83	1,00	1,29	1,26	0,96	0,98
0,00	1,20	0,94	1,25	1,24	0,93	1,04
0,00	1,16	1,05	1,29	1,15	0,98	1,02

24 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100,00	3,01	1,95	2,19	2,28	6,77	3,51
10,00	3,23	1,52	2,84	2,34	8,42	3,26
1,00	2,31	1,70	2,36	1,75	6,77	3,62
0,10	1,32	1,36	1,19	0,89	3,95	2,12
0,01	0,95	1,10	1,01	0,74	0,96	2,11
0,00	0,55	0,92	1,04	0,95	1,15	1,03
0,00	0,40	0,82	0,79	1,01	1,66	1,44

48 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100,00	3,59	1,11	1,19	1,26	2,03	3,47
10,00	2,37	1,21	1,22	1,24	2,27	2,71
1,00	2,15	1,08	1,07	1,07	1,76	2,63
0,10	1,01	0,76	1,05	1,09	1,43	2,53
0,01	0,86	0,81	1,16	1,17	1,27	1,93
0,00	0,87	0,97	1,18	1,18	0,97	1,18
0,00	0,96	0,93	0,87	1,05	0,68	1,17

[0115] МКПК человека обрабатывали изотипическим контролем SEA или SEA-CD40 (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,0001 мкг/мл) в течение 6, 24 или 48 часов. Сыворотку или супернатанты культуры ткани собирали и воспалительные цитокины оценивали с помощью мультиплексного анализа Luminex. Данные представлены в виде кратного увеличения синтеза цитокинов по сравнению с изотипическим контролем SEA. SEA-CD40 стимулировало активный синтез ИФН γ , MIP1 β и ФНО α в 6, 24 и 48 часов в МКПК, как показано ниже в Таблице 3. Уровни SEA-CD40 представлены в крайних левых столбцах. Активность наблюдалась при таких низких уровнях, как 0,010 мкг/мл SEA-CD40. Стимуляция MIP1 β и ФНО α в 24 часа показана на Фигурах 5А и 5В.

Таблица 3

МКПК

6 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100	8,75	1,18	3,00	2,51	6,91	11,66
10	13,68	1,16	7,70	3,11	11,59	17,72
1	6,21	0,89	2,71	1,48	4,55	5,58
0,1	3,89	0,89	1,61	1,26	3,40	3,04
0,01	1,49	0,75	1,07	1,26	2,11	2,26
0,001	1,60	0,71	0,89	1,31	1,30	1,28
0,0001	1,58	0,71	0,77	0,83	1,33	1,10

24 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100	8,51	4,79	5,69	2,84	13,43	19,91

10	8,98	3,96	7,87	1,91	7,58	14,97
1	3,32	1,35	3,10	1,28	8,73	3,79
0,1	1,80	1,04	1,38	1,03	5,85	5,58
0,01	1,66	0,85	1,28	1,08	2,87	1,22
0,001	1,12	0,71	0,90	0,96	1,18	2,75
0,0001	0,40	0,71	0,80	0,74	1,11	1,02

48 ч	ИФН γ	IL-8	MCP-1	MIP1 α	MIP1 β	ФНО α
100	17,92	2,58	11,47	1,51	2,81	14,02
10	8,81	3,61	3,39	1,46	2,33	5,58
1	4,09	2,07	2,36	1,32	1,91	6,47
0,1	1,82	1,19	0,84	0,96	1,00	2,30
0,01	1,03	1,02	1,41	0,95	1,13	2,09
0,001	0,83	0,86	1,13	0,93	0,96	1,93
0,0001	0,82	0,97	0,97	0,91	1,05	1,73

[0116] **Оценка маркеров активации на МКПК:** Поверхностную экспрессию костимулирующей молекулы оценивали на клеточных осадках, оставшихся после описанного выше анализа цитокинов. Клеточные осадки ресуспендировали в 50 мл FACS буфера BD и переносили в 96-луночные круглодонные микротитровальные планшеты, и Fc-рецепторы блокировали 100 мкг/мл Fc-фрагментов человека (Millipore) в течение 30 минут на льду. Основную смесь, состоящую из PE-CD86 (BD) и MHCII (Пан анти-DR, DP, DQ-антитело BD), разведенную в соотношении 1:100, получали в FACS буфере BD, содержащем 100 мг/мл человеческих Fc-фрагментов. Пять микролитров основной смеси добавляли в каждую лунку, содержащую 90 мкл, и образцы инкубировали в течение одного часа на льду. Затем клетки центрифугировали при 400g в предварительно охлажденной центрифуге Eppendorf 5810R в течение пяти минут. Супернатанты удаляли и клетки промывали 200 мл FACS буфера BD. Клетки промывали дважды, а затем ресуспендировали в 200 мл FACS буфера. Затем образцы анализировали на LSRII (BD biosciences) с программным обеспечением DIVA (BD biosciences). Среднюю флуоресценцию CD86 и MHCII определяли с использованием

программного обеспечения для анализа FlowJo. Рассчитывали соотношение между SEA-h00 и SEA-CD40 и использовали кратность изменения для вычисления диапазона активности SEA-CD40.

[0117] **Результаты:** Активация CD40 кроме инициации синтеза цитокинов способствует созреванию антигенпрезентирующих клеток. За созреванием ДК может следовать активация маркеров активации, включая CD86 и MHCII. Культуры МПКК человека стимулировали SEA-CD40 и изотипическим контролем SEA в течение 6, 24 или 48 часов и оценивали поверхностную экспрессию антигенов MHC класса II (HLA DR, DP, DQ) и CD86. Стимуляция SEA-CD40, но не изотипическим контролем, приводила к значительному увеличению как MHCII (Таблица 4), так и CD86 (данные не показаны) при таких низких концентрациях, как 0,01 мкг/мл.

Таблица 4: MHCII

SEA- CD40	6 ч	24 ч	48 ч
100	1,13	1,64	2,10
10	1,10	1,62	2,10
1	1,14	1,76	1,57
0,1	0,90	1,19	1,50
0,01	0,90	1,21	1,38
0,001	1,00	1,07	1,10
0,0001	0,85	1,05	0,99

[0118] **Роль фукозы в иммунной активации при помощи SEA-CD40:** МПКК человека выделяли, как описано выше. PBMC обрабатывали различными концентрациями SEA-CD40, исходного антитела SGN40 или F(ab)'2 варианта SEA-CD40 и инкубировали в течение 24 часов. Для оценки истощения В-клеток культуры МПКК окрашивали PE-CD19, и количество В-клеток определяли при помощи проточной цитометрии. Для оценки синтеза цитокинов супернатанты тканевой культуры МПКК собирали и оценивали синтез цитокинов путем мультиплексного анализа на платформе Luminex. Синтез ИФН γ показан на Фигуре 7 (нг/мл), и аналогичные тенденции наблюдались для других цитокинов. Для оценки созревания антигенпрезентирующих клеток, МПКК собирали после 24-часовой

инкубации и окрашивали анти-CD86 антителом или антителом к АПК-пан МНС класса II антигену (DR, DQ, DP) и процент положительных клеток оценивали при помощи проточной цитометрии. Данные показаны как средняя интенсивность флуоресценции для пан МНС маркеров.

[0119] **Результаты:** Для оценки истощения В-клеток культуры МКПК человека обрабатывали различными концентрациями SEA-CD40, дацетизумаба или SEA-CD40 F(ab')₂ в течение 24 часов. Результаты показаны на Фигуре 6. АЗКЦ-опосредованное истощение В-клеток было значительно выше в культурах, обработанных SEA-CD40, по сравнению с культурами, обработанными дацетизумабом, и эта активность была утрачена в случае SEA-CD40 F(ab')₂.

[0120] Дополнительно конечные точки иммунной активации (цитокины и маркеры активации/созревания АПК) оценивали на культурах МКПК, стимулированных SEA-CD40, дацетизумабом и SEA-CD40 F(ab')₂ в течение 24 часов. Стимуляция SEA-CD40 как синтеза цитокинов (Фигура 7), так и созревания АПК (Фигура 8) была значительно выше, чем у дацетизумаба или SEA-CD40 F(ab')₂. Эти данные показывают, что отсутствие фукозы в домене IgG не изменяет связывание с CD40, но увеличивает связывание с FcγRIIIa, приводящее к повышению активности CD40 и, в конечном счете, к повышению иммуномодулирующей активности CD40.

Пример 3: Иммуномодулирующая активность нефукозилированного антитела hS2C6

[0121] **Идентификация активных доз SEA-CD40:** Предполагается, что SEA-CD40 является активным в дозах, которые активируют антигенпрезентирующие клетки, которые могут характеризоваться активацией маркеров активации, такими как МНС класса I или II или CD86. Маркеры активации на МКПК после обработки различными концентрациями SEA-CD40 от 6 до 48 часов оценивали, как описано выше (Оценка маркеров активации на МКПК). Различие между обработками с изотипическим контролем SEA-h00 и SEA-CD40 для каждого маркера активации рассчитывали и наносят на график зависимости от концентраций SEA-CD40 и времени обработки. Самые крутые кривые ответ-концентрация наблюдались в 24 часа для CD86

и МНСII и в 48 часов для МНСI. Данные ответа-концентрация (24 ч CD86, 24 ч МНСII и 48 ч МНСI) обрабатывали при помощи нелинейной регрессии с использованием следующего уравнения, где 0% и 100% ответ определяли как наименьшие и наибольшие значения в наборе данных для каждого маркера активации, EC50 представляет собой концентрацию SEA-CD40, которая дает 50%-ный ответ.

$$\text{Ответ} = \frac{100}{1 + 10(\log_{10} \text{EC50} - \log_{10} \text{Концентрация})}$$

[0122] **Результаты:** Нормализованный ответ в зависимости от логарифма концентрации и нелинейные аппроксимированные кривые регрессии для маркеров активации показаны на Фигуре 9. Оцененные значения EC50 для МНСI, CD86 и МНСII составили 0,011, 0,14 и 0,41 мкг/мл, соответственно. Было определено, что SEA-CD40 индуцирует приблизительно 90%, 60% и 30% максимальной активации МНСI, CD86 и МНСII, соответственно, при 0,2 мкг/мл, что соответствует теоретической C_{max} в плазме, достигаемой в дозе 10 мкг/кг при внутривенном введении у людей. Эта доза предлагается в качестве теоретической первой ожидаемой активной дозы.

Пример 4. Иммуномодулирующая активность нефукозилированного антитела hS2C6

[0123] **Т-клеточный ответ, вызываемый SEA-CD40:** Линия анти-M1 Т-лимфоцитов была получена в Astarte Biologics от донора HLA-A2, который, как было показано, обладает высокой чувствительностью к пептиду вируса гриппа M1. Эти клетки метили карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловым эфиром (CFSE) и объединяли с аутологичными МКПК. Культуры стимулировали 10 мкг/мл пептида вируса гриппа M1 в присутствии или в отсутствии уменьшающихся концентраций SEA-CD40 или дацетизумаба (1, 0,1, 0,01 мкг/мл) в течение 5 суток. Культуральные супернатанты собирали и анализировали на цитокины при помощи мультиплексного анализа на платформе Luminex, и антигенспецифичные Т-лимфоциты идентифицировали с помощью специфичного связывания тетрамера M1.

[0124] **Результаты:** МКПК от донора HLA-A2, который, как было показано, обладает высокой чувствительностью к пептиду вируса

гриппа M1, стимулировали пептидом вируса гриппа M1 в присутствии или в отсутствии уменьшающихся концентраций SEA-CD40 или дацетизумаба в течение пяти суток. Результаты показаны на Фигурах 10А и 10В. Стимулированные SEA-CD40 культуры демонстрировали повышенную чувствительность к антигену вируса гриппа M1, что следует из увеличения синтеза ИФН γ и увеличения количества антигенспецифичных Т-лимфоцитов, что определяется увеличением связывания тетрамера. SEA-CD40 стимулировал антигенспецифичный Т-клеточный ответ до концентрации 0,1 мкг/мл, и эта активность была более выраженной, чем ответ, связанный с дацетизумабом.

[0125] Т-клеточный ответ, вызываемый SEA-CD40 в комбинации с антителами против ингибиторов иммунных контрольных точек: Линия анти-M1 Т-лимфоцитов была получена в Astarte Biologics от донора HLA-A2, который, как было показано, обладает высокой чувствительностью к пептиду вируса гриппа M1. Эти клетки метили CFSE и объединяли с аутологичными МКПК. Культуры стимулировали 10 мкг/мл пептида вируса гриппа M1 в присутствии или в отсутствии уменьшающихся концентраций SEA-CD40 (1, 0,1, 0,01 мкг/мл) и/или 1 мкг/мл анти-CTLA4 или анти-PD-1 антитела в течение пяти суток. Культуральные супернатанты собирали и анализировали на цитокины при помощи мультиплексного анализа на платформе Luminex, и антигенспецифичные Т-лимфоциты идентифицировали с помощью специфичного связывания тетрамера M1.

[0126] Результаты: МКПК от донора HLA-A2, который, как было показано, обладает высокой чувствительностью к пептиду вируса гриппа M1, стимулировали пептидом вируса гриппа M1 в присутствии или в отсутствии уменьшающихся концентраций SEA-CD40 и/или постоянной концентрации анти-CTLA4 блокирующего антитела или анти-PD-1-антитела. Результаты показаны на Фигурах 11 и 12. Хотя SEA-CD40, анти-CTLA4 антитела и анти-PD-1 антитела сами по себе стимулировали антигенспецифичный Т-клеточный ответ, повышенный ответ на антиген вируса гриппа M1, о чем свидетельствует увеличение синтеза ИФН- γ (Фигура 11) и увеличением количества антигенспецифичных Т-лимфоцитов, определяемое повышенным

связыванием тетрамера (Фигура 12, с использованием Тетрамер/АПК - HLA-A*02:01, пептидом вируса гриппа (GILGFVFTL) из MBL), наблюдался когда SEA-CD40 и анти-CTLA4 антитела или анти-PD-1 антитела объединяли. SEA-CD40 стимулировало антигенспецифичный Т-клеточный ответ до концентрации 0,1 мкг/мл, и эта активность усиливалась при комбинации с антителом к иммунным контрольным точкам.

[0127] **Т-клеточный ответ, вызываемый SEA-CD40 в МКПК, полученных от больных раком:** Для оценки только анти-CD40-антител МКПК выделяли из 10 мл крови пациента с опухолью и 0,25 миллиона клеток высевали в 24-луночный планшет. Образцы обрабатывали только увеличивающимися концентрациями SEA-CD40 или 1 мкг/мл объединенного пептидного пула, содержащего MageA1/MageA3/NY-ESO и увеличивающимися концентрациями или SEA-CD40, или SGN-40. Образцы культивировали в атмосфере с 10% CO₂ при температуре 37°C в течение пяти суток, супернатанты культуры ткани собирали и оценивали уровни ИФН-γ.

[0128] Для оценки SEA-CD40 в комбинации с антителами, блокирующими иммунные контрольные точки, МКПК выделяли из 10 мл крови пациентов, которым был поставлен диагноз рак молочной железы, рак поджелудочной железы или меланома, и 0,25 миллиона клеток высевали в 24-луночный планшет. Образцы обрабатывали возрастающими концентрациями SEA-CD40, 1 мкг/мл объединенного пептидного пула, содержащего MageA1/MageA3/NY-ESO, и или 1 мкг/мл анти-PD1 антитела, или анти-CTLA4 антитела. Образцы культивировали в атмосфере с 10% CO₂ при температуре 37°C в течение 5 суток, супернатанты культуры ткани собирали и оценивали уровни ИФН-γ.

[0129] **Результаты:** МКПК от доноров выделяли из цельной крови, как описано выше. Донорами были три пациента с диагнозом меланома, три пациента с диагнозом рак молочной железы и три пациента с диагнозом рак поджелудочной железы. МКПК доноров стимулировали пулом пептидов общих белков опухолевых антигенов (MAGEA1/MAGE3/NY-ESO) в присутствии или отсутствии возрастающих концентраций SEA-CD40 или SGN-40 в течение 5 суток. Супернатанты

культуры ткани собирали и оценивали уровень ИФН- γ . Результаты показаны на Фигуре 13. Шесть из девяти пациентов продемонстрировали антигензависимый ИФН- γ -ответ, который был значительно усилен обработкой SEA-CD40 по сравнению с обработкой SGN-40. В обработанных SEA-CD40 МКПК стимуляция наблюдалась при концентрациях 10 мкг/мл.

[0130] МКПК от доноров выделяли из цельной крови, как описано выше. Как указано выше, донорами были три пациента с диагнозом меланомы, три пациента с диагнозом рак молочной железы и три пациента с диагнозом рак поджелудочной железы. МКПК доноров стимулировали пулом пептидов общих белков опухолевых антигенов (MAGEA1/MAGE3/NY-ESO) в присутствии или в отсутствии возрастающих концентраций SEA-CD40 и/или постоянной концентрации анти-CTLA4 или анти-PD1 блокирующего антитела. Результаты показаны на Фигуре 14. Хотя SEA-CD40 и антитела против блокаторов контрольных точек PD1 и CTLA4 сами по себе стимулировали антигенспецифичный Т-клеточный ответ, ярко выраженный сигнал на опухолевый антиген, измеренный по синтезу ИФН- γ , наблюдался, когда SEA-CD40 объединяли или с анти-CTLA4 антителами, или с анти-PD1 антителами.

Пример 5. Мышиные модели для оценки активности нефукозилированных анти-CD40-антител

[0131] Было показано, что мышиные модели применимы для оценки эффективности и механизмов действия новых противораковых препаратов. Исследование SEA-CD40 на мышиных моделях рака было затруднительным, поскольку SEA-CD40 не распознает мышиный CD40. Поэтому для оценки активности нефукозилированных анти-CD40-антител была разработана сингенная мышиная опухолевая модель. Функциональные мышиные эквиваленты человеческого IgG1 и человеческого Fc γ RIII/CD16 представляют собой мышиные IgG2a и Fc γ RIV, соответственно, и связывание мышиного IgG2a с мышиным Fc γ RIV опосредует АЗКЦ. См., например, Bruhns, Blood 119: 5640-5649 (2012) и Nimmeriahn et al., Immunity 23: 41-51 (2005). Крысиное антитело 1C10 использовали для получения суррогата SEA-CD40. См., например, Heath et al., Eur. J. Immunol. 24: 1828-

1834 (1994). В кратком изложении, фрагменты гена VL и VH моноклонального антитела крысы, которое распознает мышинный CD40, антитела 1C10, были клонированы в 5'-рамку считывания фрагментов мышинного Скаппа и мышинного IgG2a CH1-CH2-CH3, соответственно. Экспрессией полученных генов в клетках CHO получали химерное антитело 1C10 с крысиными VL и VH доменами и мышинными доменами легкой и тяжелой цепи изотипа IgG2a (mIgG2a 1C10). mIgG2a 1C10 экспрессировали в присутствии 2-фторфукозы в среде для роста клеток CHO, используя способы, описанные в Примере 1, для получения нефукозилированной формы mIgG2a 1C10 (mIgG2aSEA 1C10). Фукозилированные mIgG2a 1C10 и mIgG2a SEA 1C10 проверяли на наличие противоопухолевой активности с использованием мышинной модели меланомы B16.

[0132] **Оценка связывания нефукозилированного мышинного антитела с Fcγ-рецепторами мыши:** клетки CHO, стабильно экспрессирующие мышинный FcγRI или FcγRIV, инкубировали с возрастающими концентрациями фукозилированного mIgG2a 1C10 или нефукозилированного mIgG2a 1C10 (mIgG2a SEA-1C10). Образцы промывали и добавляли насыщающее количество PE-антимышиного IgG и инкубировали с образцами на льду в течение тридцати минут. Образцы снова промывали и меченные клетки анализировали при помощи проточной цитометрии.

[0133] **Результаты:** Оценивали связывание суррогатных анти-CD40 антител с клеткам яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующим мышинный FcγRI или FcγRIV (мышинный эквивалент человеческого FcγRIII/CD16). Результаты показаны на Фигурах 15A и 15B. Как ожидалось, mIgG2a 1C10 связывается с FcγR1 с такой же аффинностью, как и mIgG2a SEA 1C10. См., например, Фигуру 15A. Однако нефукозилированный mIgG2a SEA 1C10, связывается с FcγRIV со значительно более высокой аффинностью, чем фукозилированное исходное антитело mIgG2a 1C10. См., например, Фигуру 15B.

[0134] **Оценка нефукозилированных анти-CD40-антител в мышинной опухолевой модели:** 250.0E+3 клеток меланомы B16F10 подкожно вводили мышам линии C57BL/6. Мышей случайным образом распределяли по когортам с размером опухоли в среднем

приблизительно 50 мм³. Затем мышам вводили внутрибрюшинные инъекции или изотипического контроля (mIgG2a), или фукозилированного mIgG2a 1C10, или нефукозилированного mIgG2a 1C10 (mIgG2a SEA 1C10), через сутки в общей сложности три дозы. Мышей наблюдали до тех пор, пока размер опухоли не достигал 1000 мм³, в этот момент мышей умерщвляли.

[0135] Результаты: Модель сингенную модель меланомы B16F10 использовали для оценки *in vivo* эффективности полученных нефукозилированных суррогатов анти-CD40-антител. Мышам линии C57BL/6 имплантировали клетки меланомы B16F10, а затем вводили или изотипический контроль mIgG2a, или фукозилированный mIgG2a 1C10, или нефукозилированный mIgG2a 1C10 (mIgG2a SEA 1C10). Проводили мониторинг опухолевой нагрузки, и мышей умерщвляли, когда размер опухоли достигал 1000 мм³. Результаты показаны на Фигуре 16. Мыши, получавшие нефукозилированный SEA-1C10 mIgG2a, показали значительное преимущество в выживаемости и задержку развития опухоли по сравнению с мышами, получавшими фукозилированное исходное антитело IgG2a 1C10.

Пример 6: SEA-CD40 истощает В-клетки и стимулирует активацию Т-лимфоцитов

[0136] Активность SEA-CD40 сравнивали с родственным фукозилированным антителом и с полностью агонистическим анти-CD40-антителом, клон 21.4.1. Антитело 21.4.1 представляет собой человеческое анти-CD40 IgG2k агонистическое антитело, которое является исходным клоном CP-870,893, антитела, которое в настоящее время проходит клинические испытания для лечения солидных опухолей в комбинации с PDL1. Информацию о аминокислотной последовательности для антитела 21.4.1 см., например, в Патенте США No. 7338660, который включен в настоящее изобретение для всех целей. Для антител были протестированы три функциональные области: способность управлять дифференцировкой, активацией и истощением В-клеток человека, способностью активировать первичные культуры МПКК человека и способностью активировать антигенспецифичный ответ.

[0137] **Оценка активации В-клеток анти-CD-40 антителами:** Эксперименты проводили с использованием очищенных В-клеток из

свежей цельной крови человека или мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК). В-клетки выделяли из свежей цельной крови человека с использованием набора реагентов для выделения RosetteSep. Выделенные очищенные В-клетки культивировали с возрастающими концентрациями SEA-CD40, антитела 21.4.1 или гексамерного лиганда CD40, Enzo Life Sciences (10, 1, 0,1, 0,01 или 0,001 мкг/мл) в течение 24 часов. Активацию В-клеток оценивали как активацию CD80 при помощи проточной цитометрии.

[0138] МКПК выделяли, как описано выше, и затем культивировали с возрастающими концентрациями SEA-CD40, антитела 21.4.1 или гексамерного CD40L (10, 1, 0,1, 0,01 или 0,001 мкг/мл) в течение 24 часов. Общее количество В-клеток оценивали путем окрашивания CD19 при помощи проточной цитометрии.

[0139] **Результаты:** иммуномодулирующая активность SEA-CD40 зависит от Fc-части антитела и ее взаимодействия с CD16, рецептором FcγRIII. Результаты показаны на Фигуре 17. SEA-CD40 не индуцирует активацию В-клеток в очищенных культурах В-клеток, в которых отсутствуют клетки, которые экспрессируют рецепторы Fcγ, необходимые для связывания с SEA-CD40. Это отличается от активирующего CD40 антитела 21.4.1, которое способно вызывать активацию В-клеток в чистых культурах В-клеток, аналогично лиганду CD40.

[0140] МКПК включают клетки, которые экспрессируют рецепторы Fcγ. Результаты для данной популяции клеток показаны на Фигуре 18. В случае культур МКПК SEA-CD40 стимулировало АЗКЦ-опосредованное истощение В-клеток, в то время как обработка антителом 21.4.1 не приводила к истощению В-клеток.

[0141] **Оценка активации моноцитов/макрофагов анти-CD-40 антителами:** Культуры МКПК человека выделяли, как описано выше. Культуры МКПК стимулировали возрастающими концентрациями (0,0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 или 10 мкг/мл) SEA-CD40, дацетизумаба, антитела 21.4.1 или изотипического контроля SEA в течение 24 часов. Активация CD80 являлась маркером созревания моноцитов. Поверхностную экспрессию CD80 оценивали при помощи проточной

цитометрии.

[0142] **Результаты:** Результаты показаны на Фигуре 19. Обработка МКПК SEA-CD40 индуцирует ярко выраженную активацию моноцитов/макрофагов, измеренную по активации CD80, и эта активация находится на одном уровне с активацией, наблюдаемой с активирующим CD40 антителом 21.4.1.

[0143] **Оценка индукции цитокинов анти-CD40 антителами:** Культуры МКПК человека выделяли, как описано выше. Культуры МКПК стимулировали возрастающими концентрациями (0,0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 или 10 мкг/мл) SEA-CD40, дацетизумаба, антитела 21.4.1 или изотипического контроля SEA в течение 24 часов. После стимуляции собирали супернатанты тканевой культуры и проводили оценку воспалительных цитокинов с помощью мультиплексного анализа Luminex.

[0144] **Результаты:** Результаты показаны на Фигуре 20 и Фигуре 21. На Фигуре 20 показано, что SEA-CD40 и активирующее CD40 антитело 21.4.1 индуцируют цитокины ИФН- γ и хемокины, важные для индуцирования выраженных Т-клеточных ответов. На Фигуре 21 показана индукция интерлейкина 10 (IL10) с помощью антител. В отличие от антитела 21.4.1, которое стимулирует синтез IL10, SEA-CD40 снижает уровень иммунодемпфирующего цитокина IL-10.

[0145] **Оценка индукции Т-лимфоцитов анти-CD40-антителами:** Культуры МКПК человека выделяли, как описано выше. 1×10^6 МКПК культивировали в среде DMEM+10% ФБС и инкубировали с 5 мкг пептида вируса гриппа M1 и с возрастающими концентрациями (0,0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 или 10 мкг/мл) SEA-CD40, дацетизумаба или антитела 21.4.1 в течение пяти суток. Затем собирали клетки и супернатанты клеточной культуры. Уровни ИФН- γ оценивали в супернатантах. Т-лимфоциты, специфичные для антигена вируса гриппа, оценивали путем окрашивания тетрамера при помощи проточной цитометрии. Процент регуляторных Т-лимфоцитов, CD4+, CD25+, CD127 малочисленной популяции клеток определяли с использованием проточной цитометрии.

[0146] **Результаты:** Результаты показаны на Фигурах 22-24. После инкубации в течение пяти суток SEA-CD40 индуцирует более

высокие уровни ИФН- γ по сравнению с дацетизумабом или антителом 21.4.1, см., например, Фигуру 22. На фигуре 23 показано, что SEA-CD40 индуцирует выраженный специфичный по отношению к антигену вируса гриппа Т-клеточный ответ, аналогичный тому, который наблюдается с антителом 21.4.1. Однако на Фигуре 24 показано, что SEA-CD40 также уменьшает количество иммуноингибирующих регуляторных Т-лимфоцитов, присутствующих после стимуляции пептидом вируса гриппа. Эта активность, вероятно, связана с уменьшением синтеза IL10, наблюдаемым после обработки МКПК SEA-CD40. В отличие от этого, после инкубации с антителом 21.4.1, МКПК показали увеличенное число регуляторных Т-лимфоцитов, как показано на Фигуре 24.

Следует понимать, что описанные здесь примеры и варианты осуществления изобретения, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в свете этого могут быть предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем данной заявки, а также в объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в настоящее изобретение путем ссылки для всех целей.

Неформальный список последовательностей

SEQ ID NO:1; тяжелая цепь hS2C6

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSY

70	80	90	100	110	120
NQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSASTKGP					

130	140	150	160	170	180
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS					

190	200	210	220	230	240
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF					

250	260	270	280	290	300
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV					

310	320	330	340	350	360
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV					

370	380	390	400	410	420
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF					

430	440
SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	

SEQ ID NO:2; легкая цепь hS2C6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRF

70	80	90	100	110	120
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGGQTKVEIKRTVAAPSV					

130	140	150	160	170	180
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL					

190	200	210
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SEATTLE GENETICS, INC.
<120> ДОЗИРОВКА И ВВЕДЕНИЕ НЕФУКОЗИЛИРОВАННЫХ АНТИ-CD40 АНТИТЕЛ
<130> 0040-00712PC
<150> US 62/072,031
<151> 2014-10-29
<150> US 62/134,955
<151> 2015-03-18
<160> 2
<170> Патентная версия 3.5
<210> 1
<211> 444
<212> Белок
<213> Искусственная
<220>
<223> Тяжелая цепь hS2C6
<400> 1

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

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

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

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	145	150	155			160
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu		165	170			175
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	180		185			190
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	195		200			205
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	210		215			220
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	225		230			235
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val		245	250			255
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe		260	265			270
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	275		280			285
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	290		295			300
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	305		310			315
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala		325	330			335
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg		340	345			350
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly		355	360			365
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	370		375			380
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	385		390			395

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 2
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Легкая цепь hS2C6

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий стадии введения анти-CD40 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где анти-CD40 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека; где эта константная область имеет N-гликозидсвязанную сахарную цепь в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% N-гликозидсвязанных сахарных цепей включают остаток фукозы; и где анти-CD40 антитело вводится в дозе от 0,1 до 2000 мкг/кг массы тела пациента.

2. Способ по п.1, где уровень дозы составляет от 10 до 1000 мкг/кг.

3. Способ по п.1, где уровень дозы составляет от 50 до 800 мкг/кг.

4. Способ по п.1, где уровень дозы составляет от 75 до 600 мкг/кг.

5. Способ по п.1, где уровень дозы составляет от 100 до 500 мкг/кг.

6. Способ по п.1, где уровень дозы находится в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из 100-300 мкг/кг, 300-500 мкг/кг, 500-700 мкг/кг, 700-900 мкг/кг и 900-1100 мкг/кг.

7. Способ по п.1, где уровень дозы находится в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из 100-150 мкг/кг, 150-200 мкг/кг, 200-250 мкг/кг, 250-300 мкг/кг, 300-350 мкг/кг, 350-400 мкг/кг, 400-450 мкг/кг, 450-500 мкг/кг, 500-550 мкг/кг, 550-600 мкг/кг, 600-650 мкг/кг, 650-700 мкг/кг, 700-750 мкг/кг, 750-800 мкг/кг, 800-850 мкг/кг, 850-900 мкг/кг, 900-950 мкг/кг, 950-1000 мкг/кг, 1000-1050 мкг/кг и 1050-1100 мкг/кг.

8. Способ по п.1, где уровень дозы является членом группы, состоящей из примерно 60 мкг/кг, примерно 100 мкг/кг, примерно 150 мкг/кг, примерно 200 мкг/кг, примерно 250 мкг/кг, примерно 300 мкг/кг, примерно 350 мкг/кг, примерно 400 мкг/кг, примерно 450 мкг/кг, примерно 500 мкг/кг, примерно 550 мкг/кг, примерно 600 мкг/кг, примерно 650 мкг/кг, примерно 700 мкг/кг, примерно 750 мкг/кг, примерно 800 мкг/кг, примерно 850 мкг/кг, примерно

900 мкг/кг, примерно 950 мкг/кг, примерно 1000-1050 мкг/кг, примерно 1050 мкг/кг и 1110 мкг/кг.

9. Способ по п.1, где анти-CD40 антитело вводят каждые три недели.

10. Способ по п.1, где анти-CD40 антитело вводят каждые шесть недель.

11. Способ по п.1, где пациент имеет CD40-положительный рак.

12. Способ по п.1, где пациент имеет CD40-отрицательный рак.

13. Способ лечения рака, включающий стадии введения анти-CD40 антитела и анти-CTLA4 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где анти-CD40 антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека; где эта константная область гликозилирована в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% гликозилированных цепей содержат остаток фукозы.

14. Способ по п.13, где анти-CTLA4 антитело выбрано из группы, состоящей из ипилимумаба и тремелиумаба.

15. Способ лечения рака, включающий стадии введения анти-CD40 антитела и анти-PD1 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где анти-CD40 антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека; где эта константная область гликозилирована в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% гликозилированных цепей содержат остаток фукозы.

16. Способ по п.15, где анти-PD1 антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пидилизумаба и пемролизумаба.

17. Способ лечения рака, включающий стадии введения анти-CD40 антитела и анти-PD-L1 антитела пациенту, нуждающемуся в таком лечении, где анти-CD40 антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:1 и

вариабельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO:2 и константную область человека; где эта константная область гликозилирована в остатке N297 в соответствии с индексом EU, как указано в Kabat, и менее чем 5% гликозилированных цепей содержат остаток фукозы.

18. Способ по п.17, где анти-PD-L1 антитело выбрано из группы, состоящей из MEDI4736 и MPDL3280A.

19. Способ по п.1, где рак представляет собой рак крови.

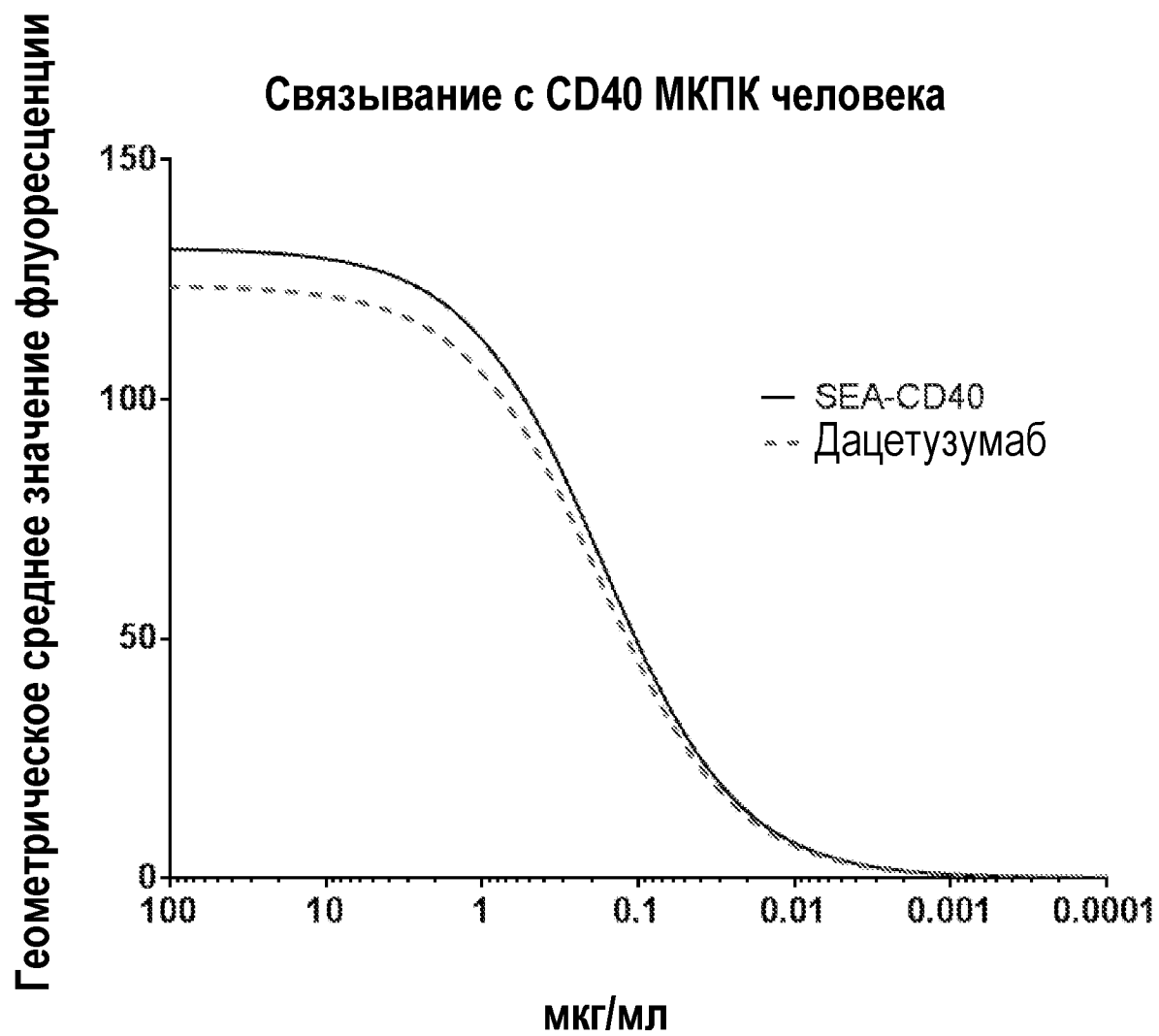
20. Способ по п.1, где рак представляет собой солидную опухоль.

21. Способ по п.13, 15 или 17 где рак представляет собой рак крови.

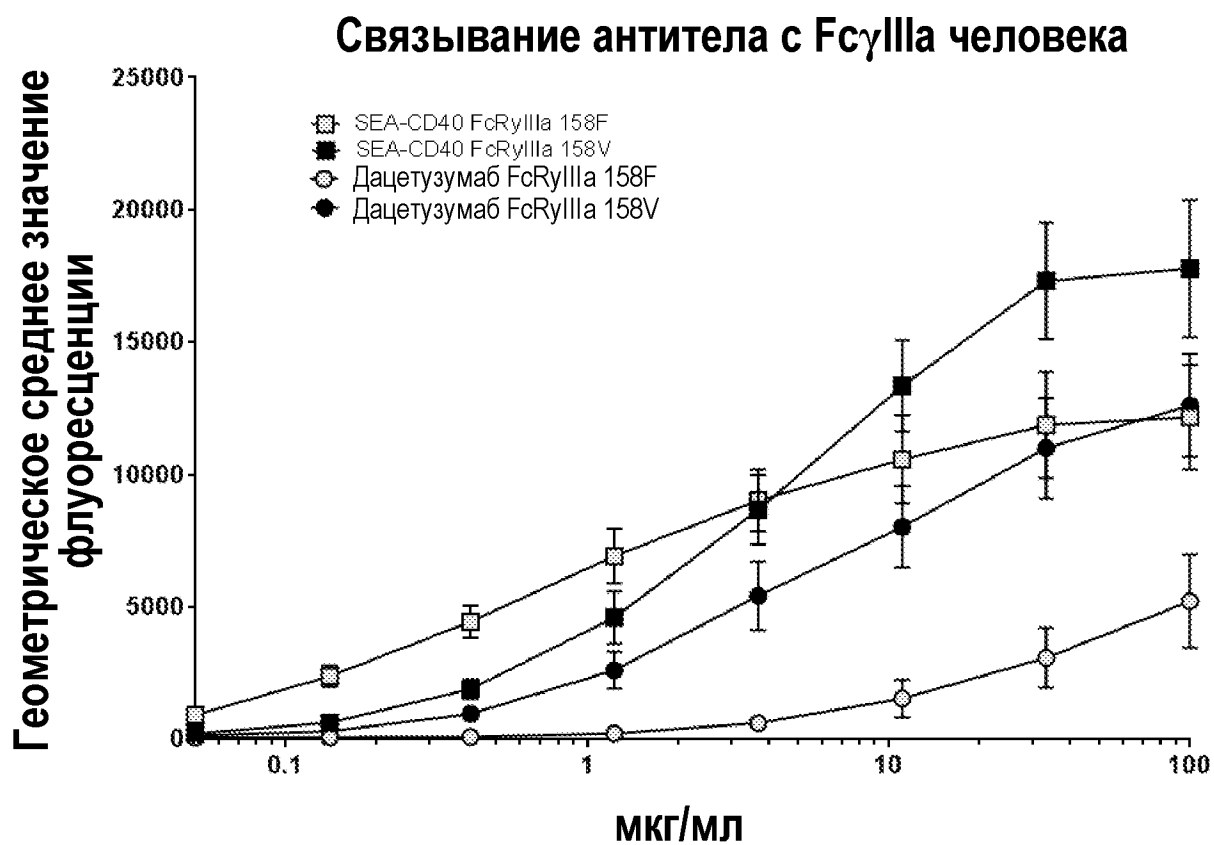
22. Способ по п.13, 15 или 17 где рак представляет собой солидную опухоль.

По доверенности

ФИГ. 1



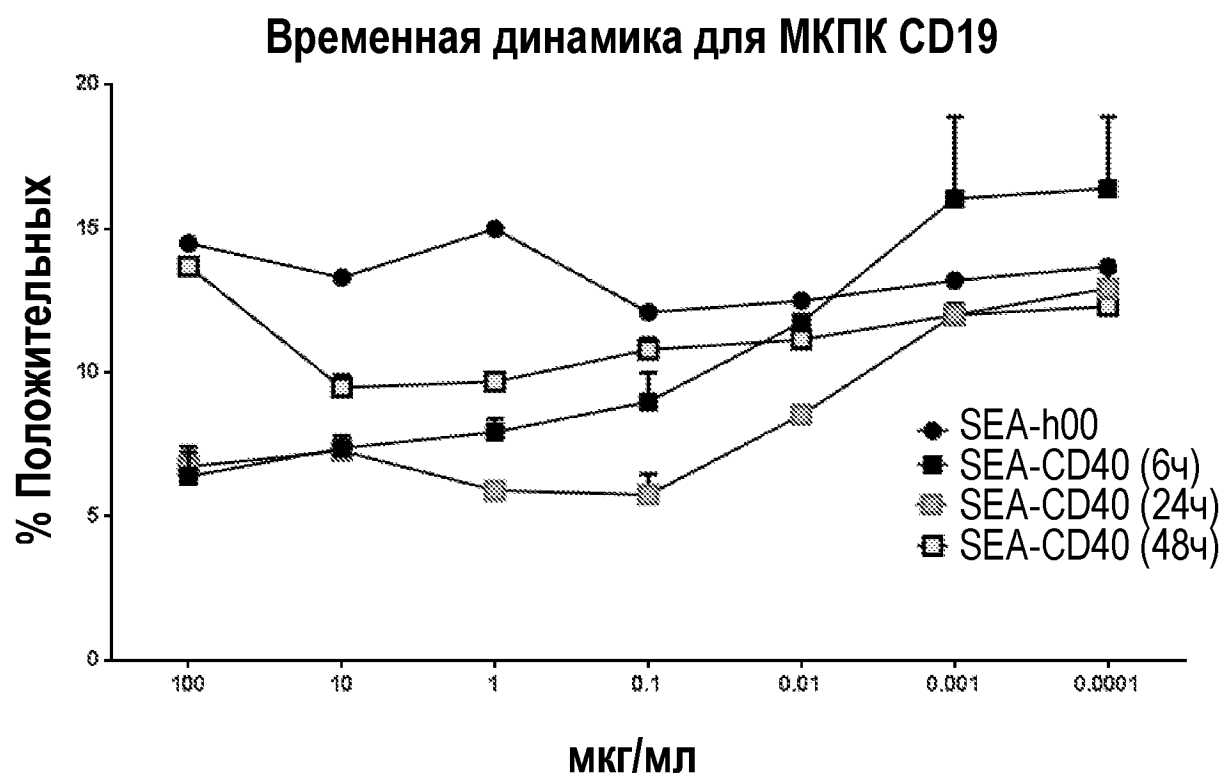
ФИГ. 2А



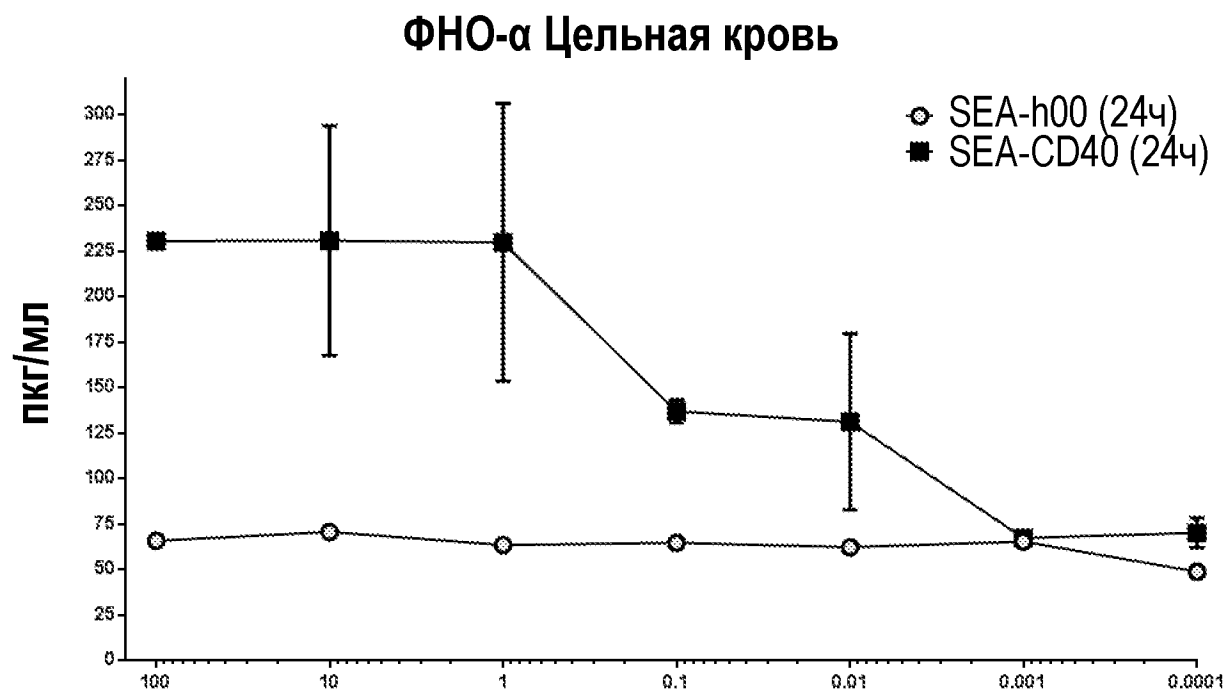
ФИГ. 2В

FcγRIIIa (158F)	27.5 nM	302.7nM
FcγRIIIa (158V)	5.2 nM	37.9nM

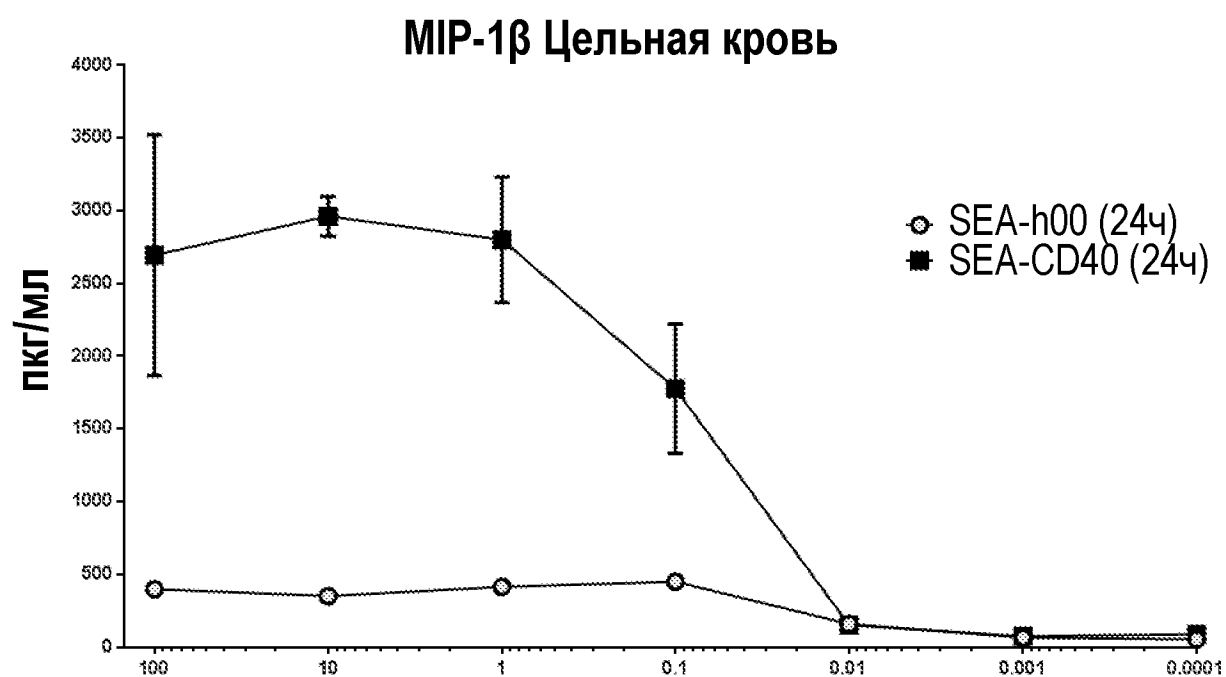
ФИГ. 3



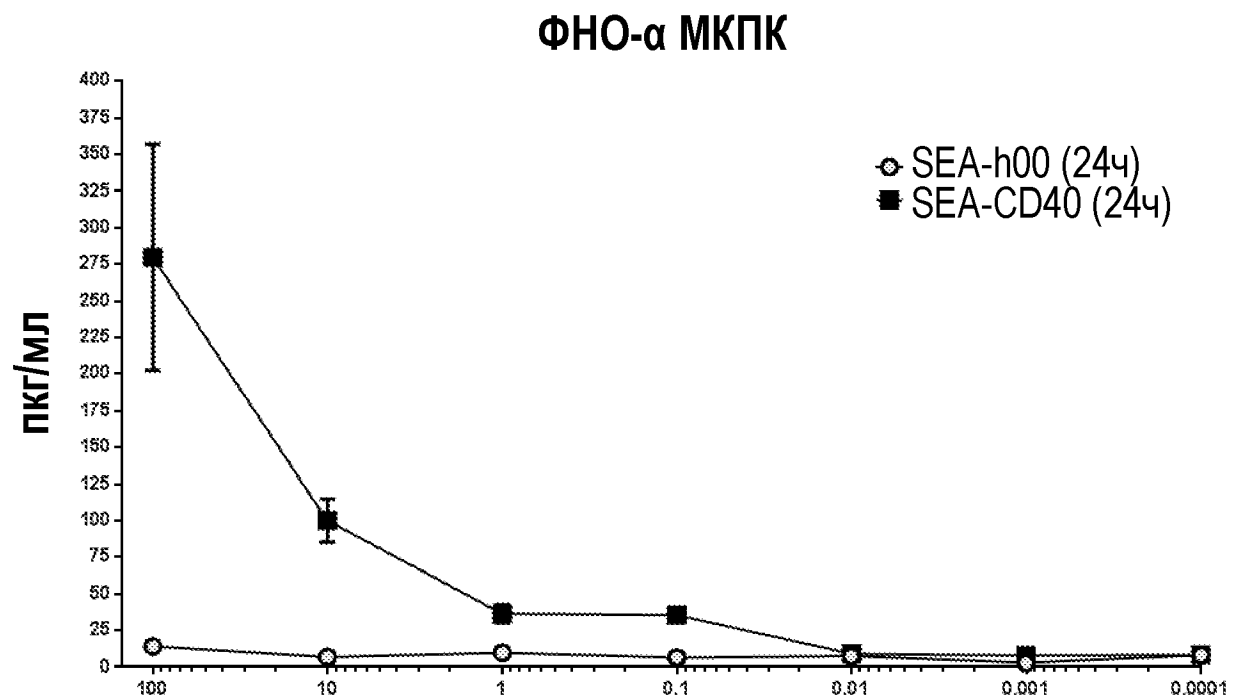
ФИГ. 4А



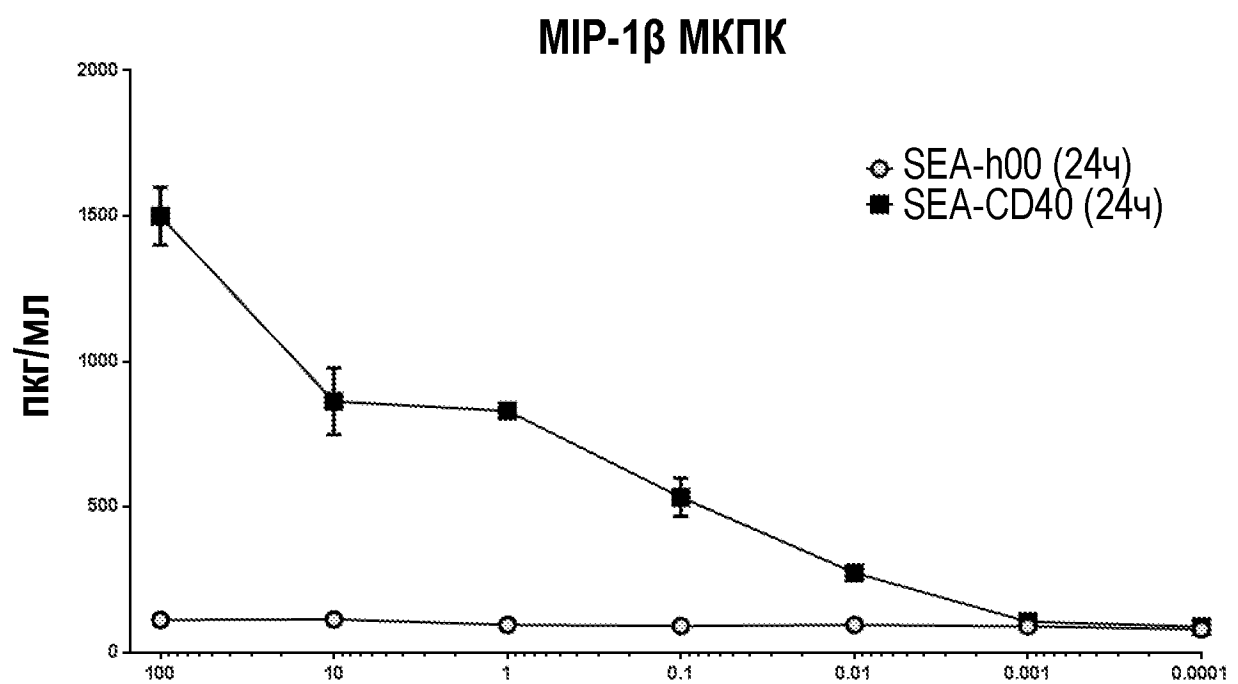
ФИГ. 4В



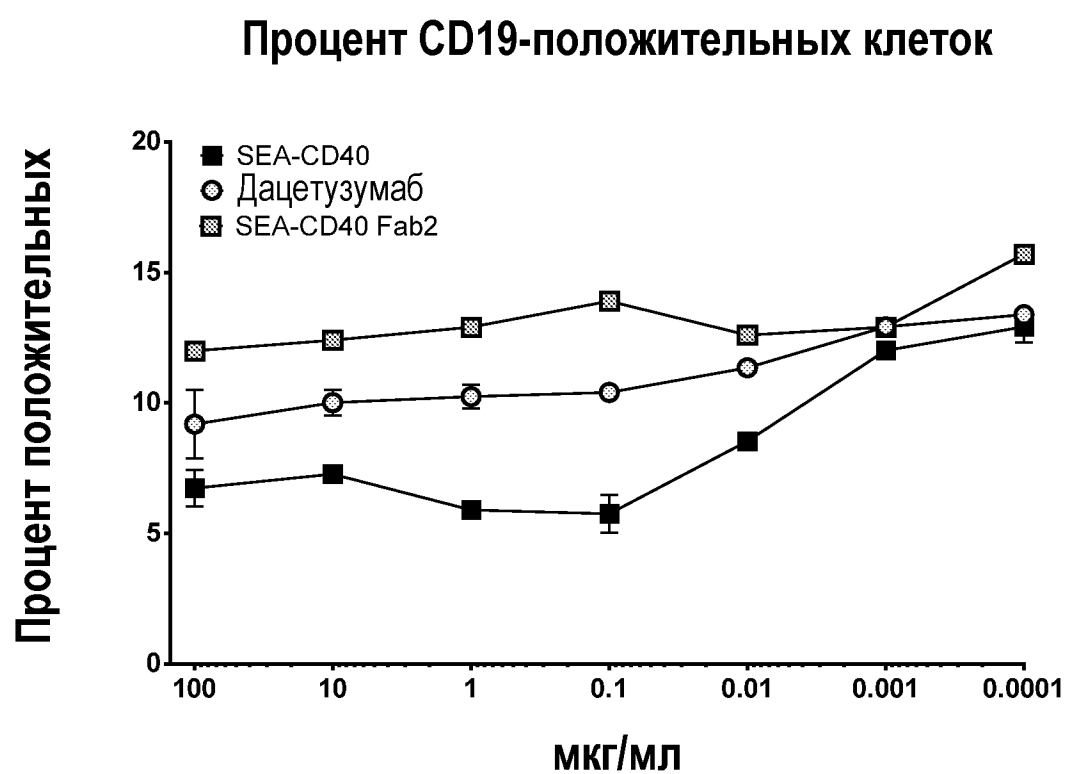
ФИГ. 5А



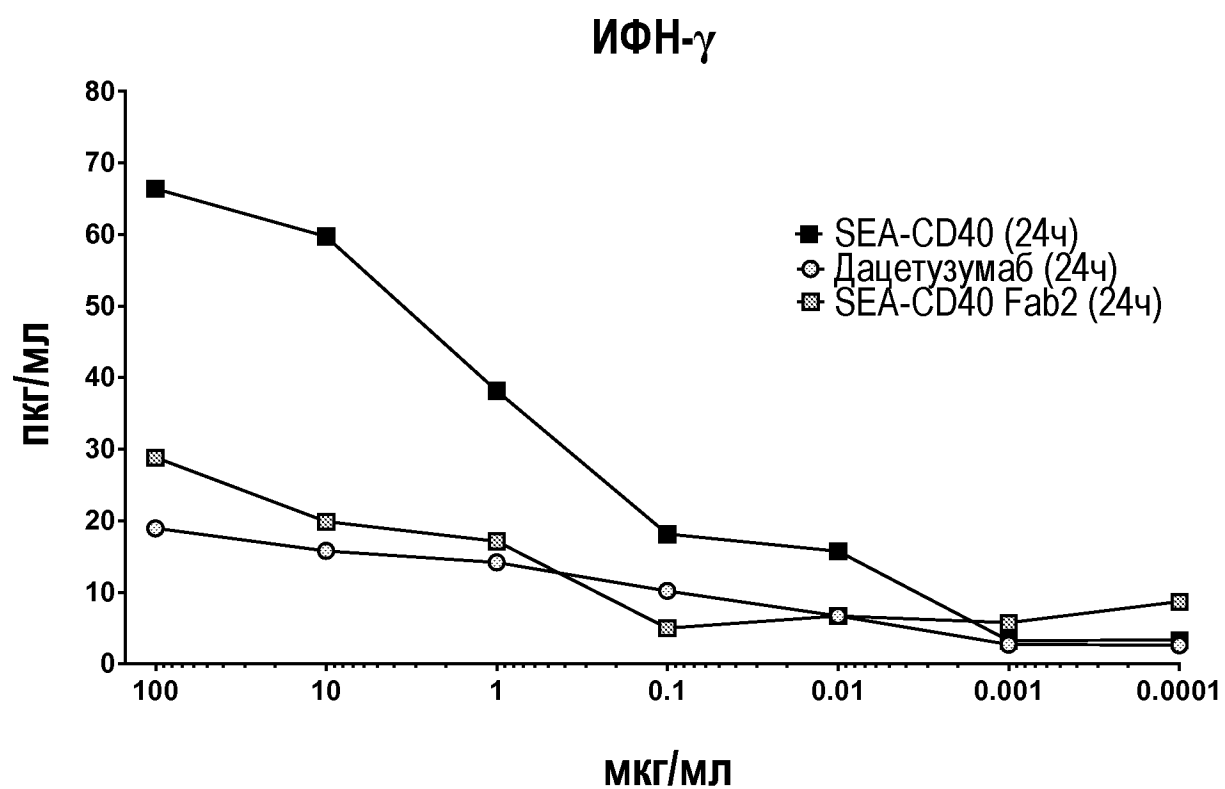
ФИГ. 5В



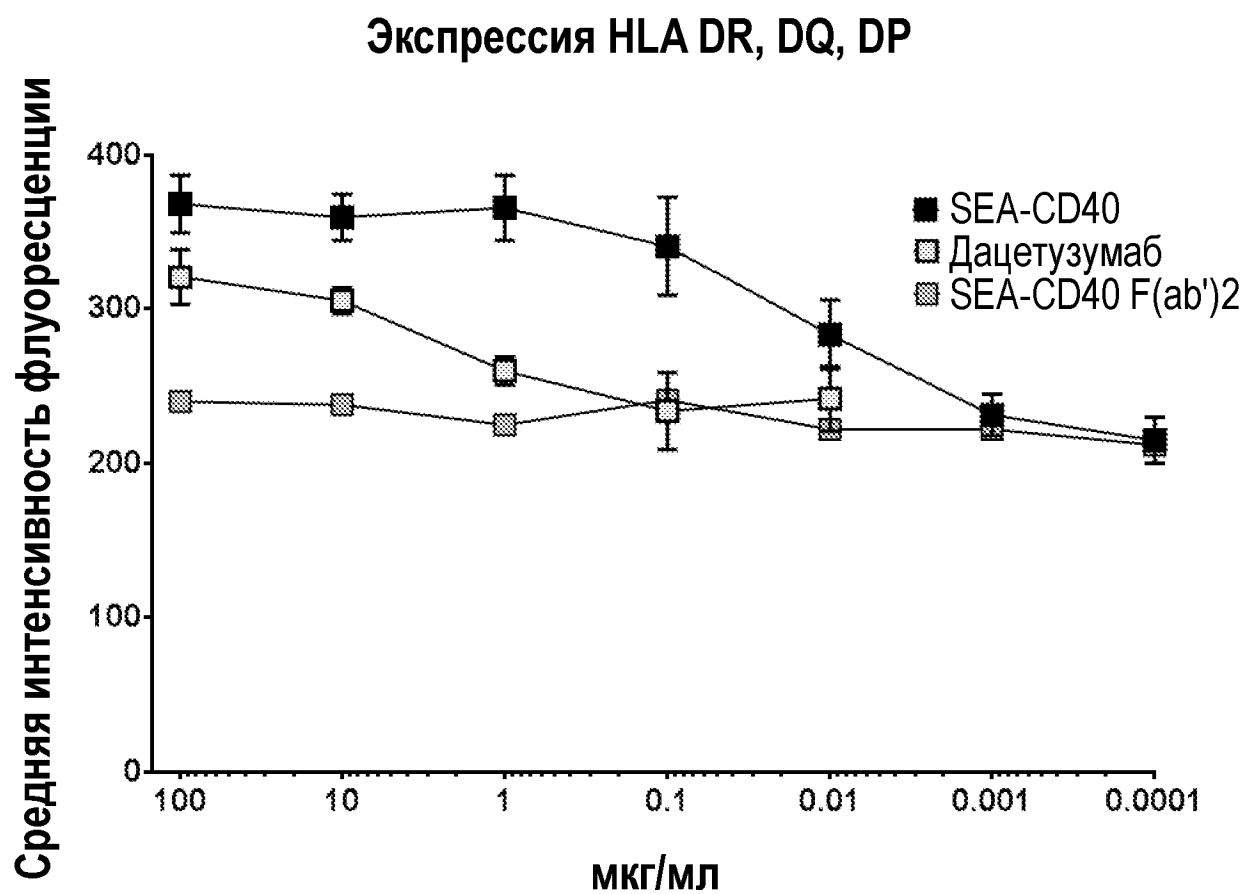
ФИГ. 6



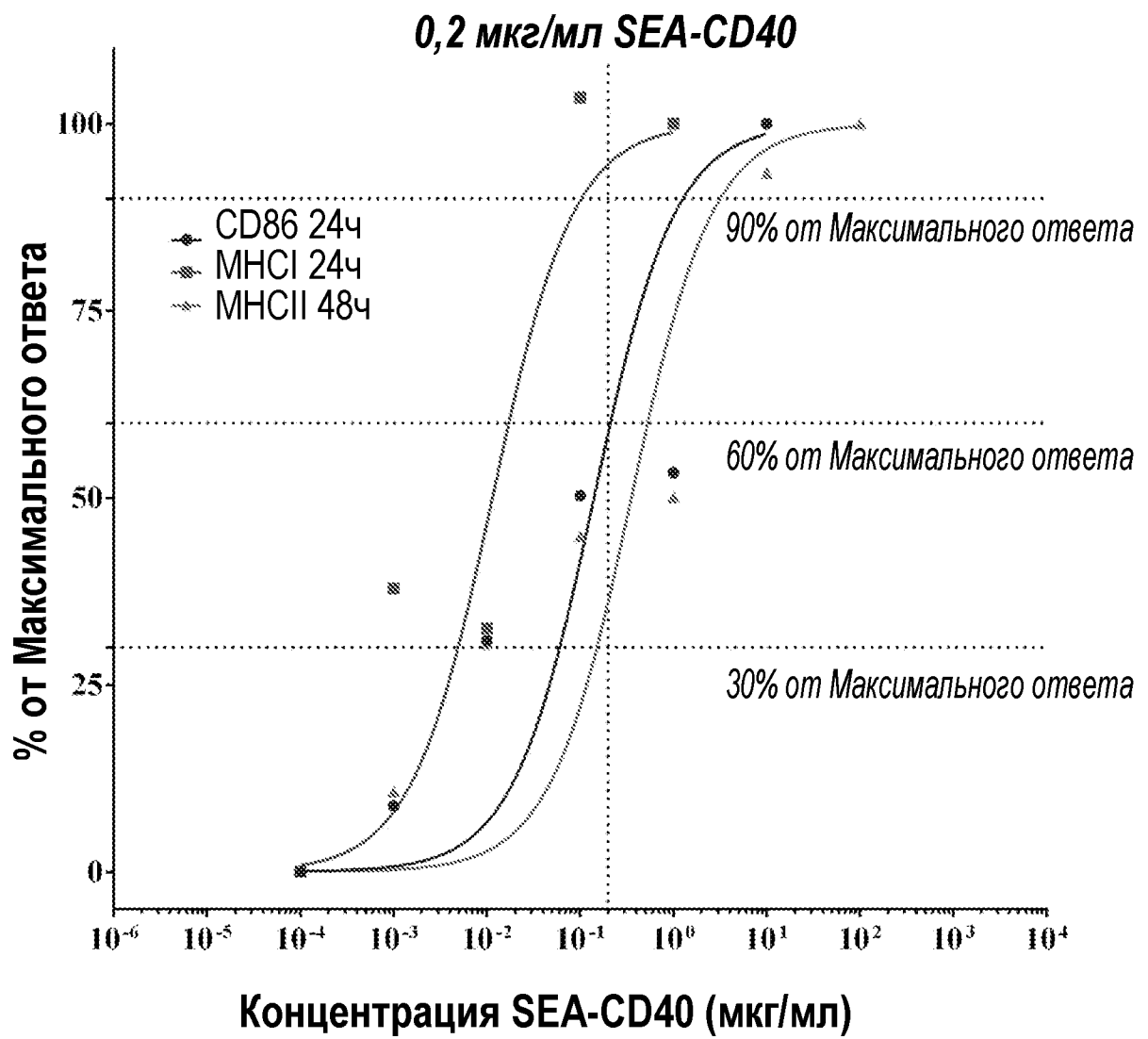
ФИГ. 7



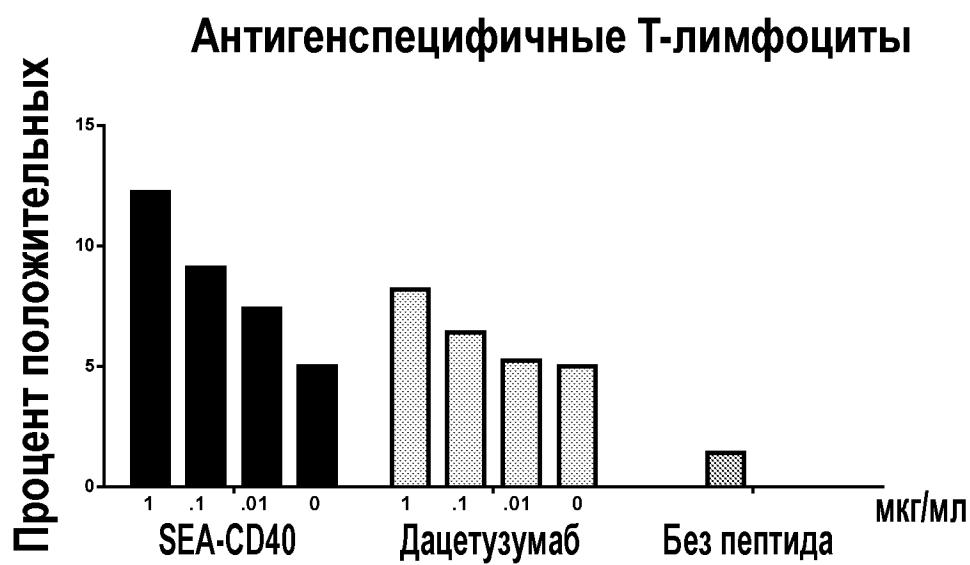
ФИГ. 8



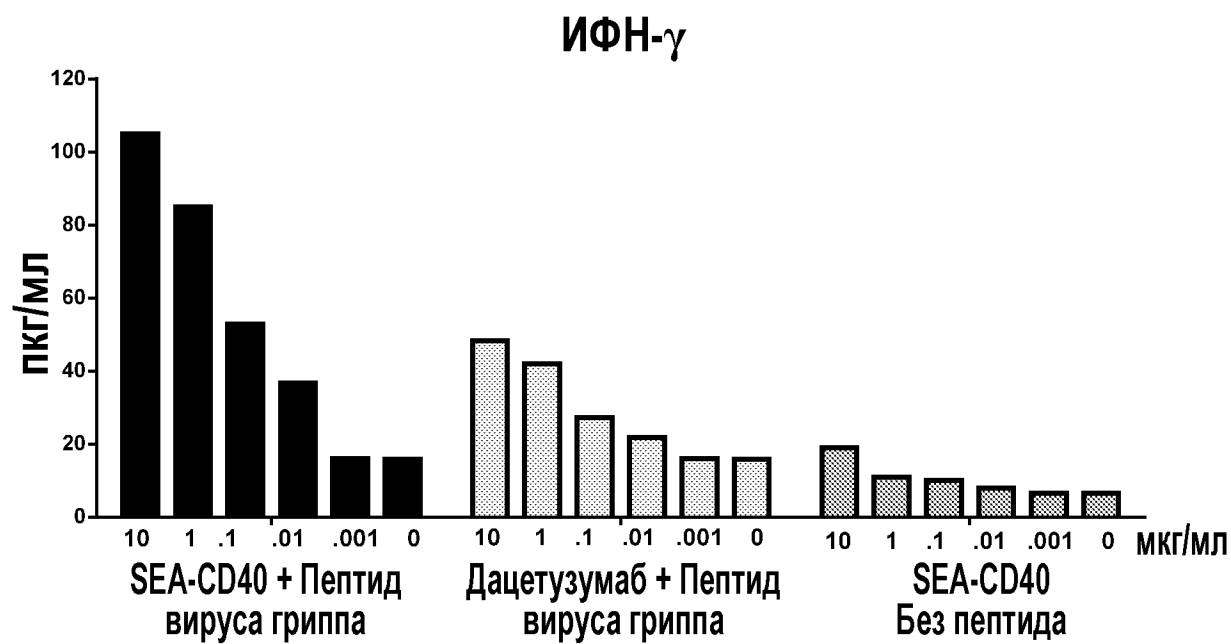
ФИГ. 9



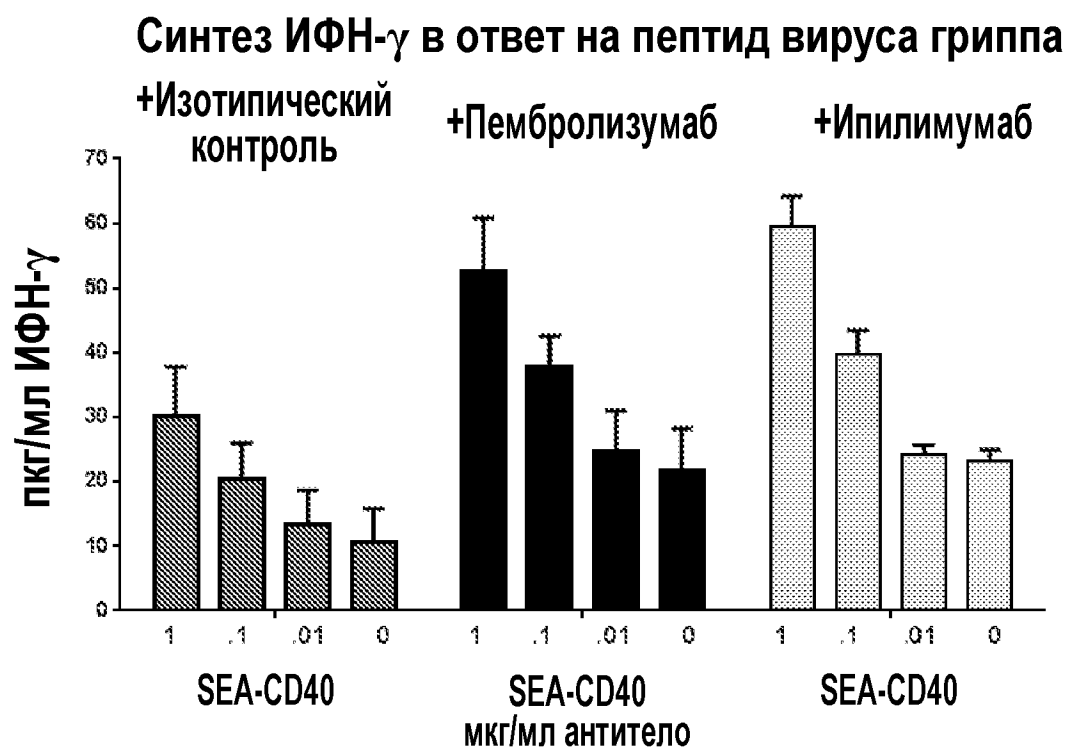
ФИГ. 10А



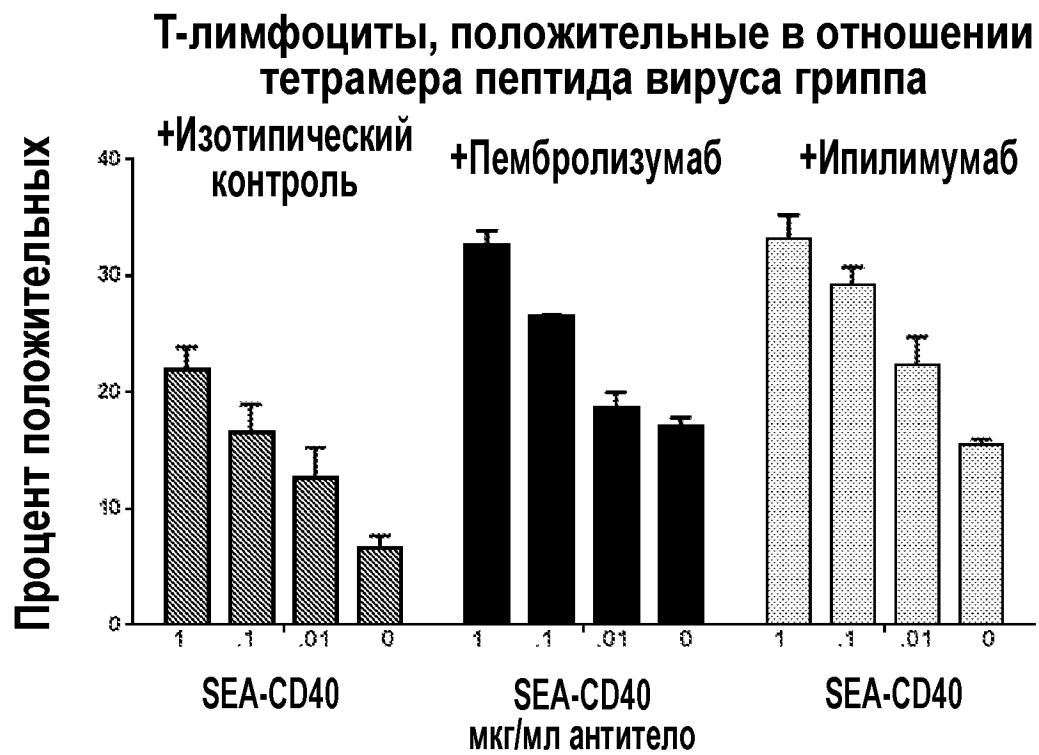
ФИГ. 10В



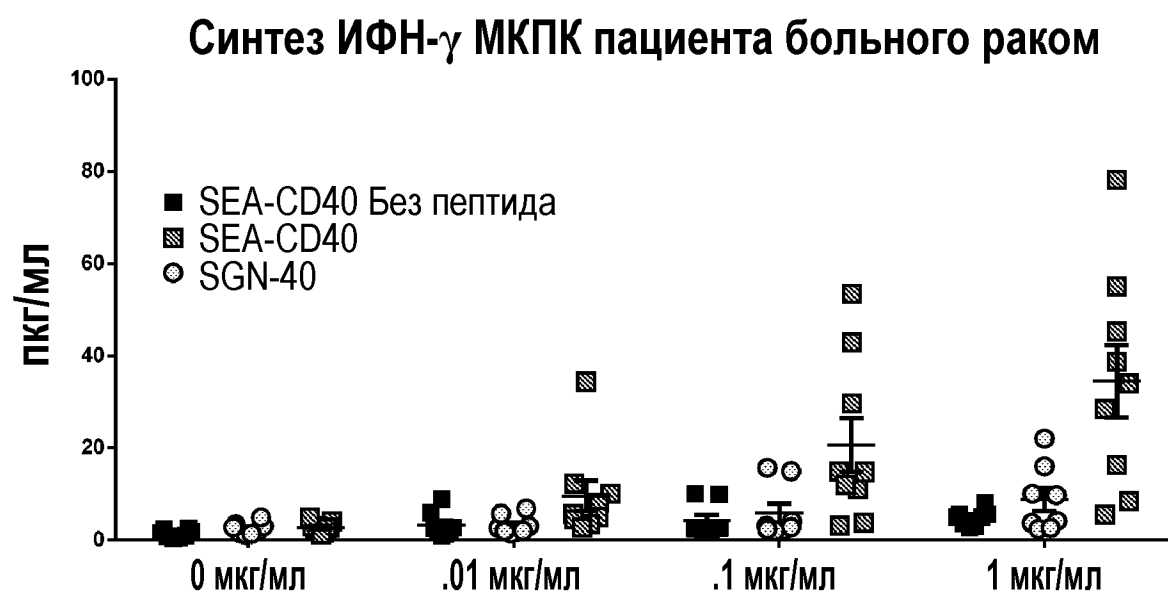
ФИГ. 11



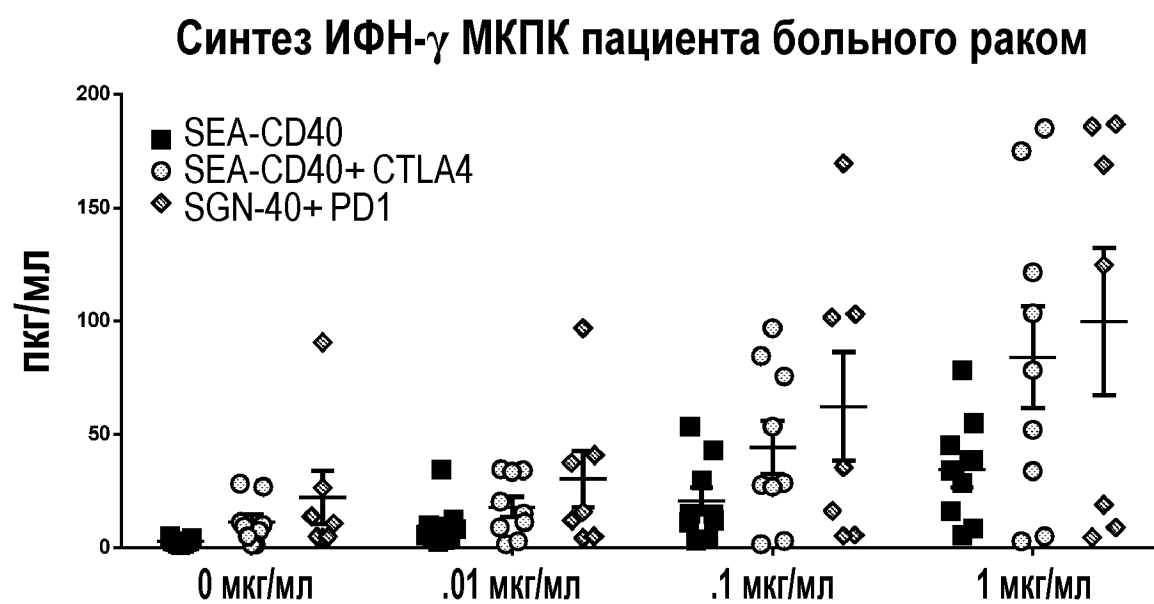
ФИГ. 12



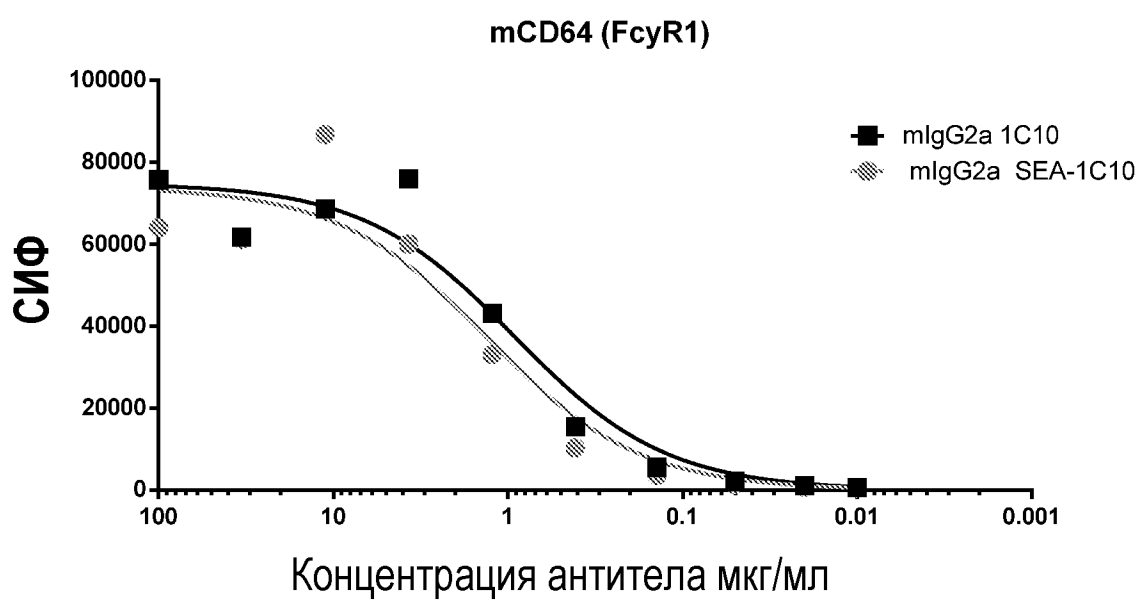
ФИГ. 13



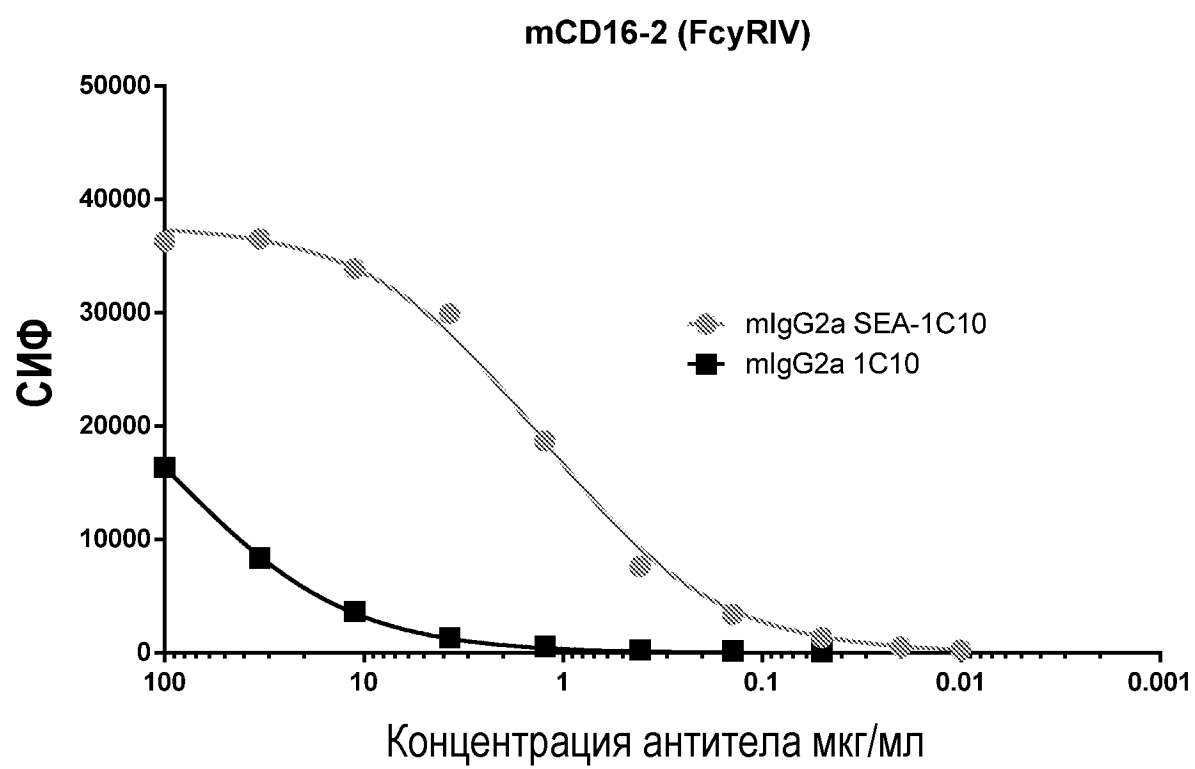
ФИГ. 14



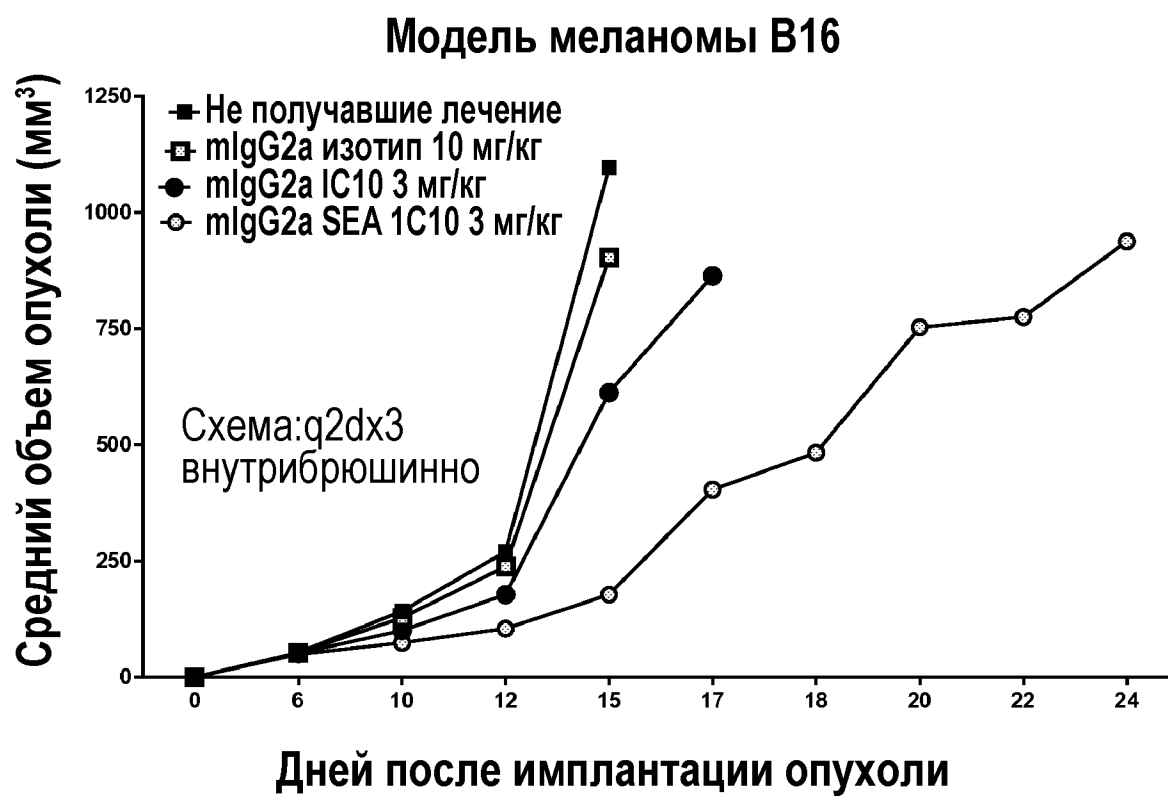
ФИГ. 15А



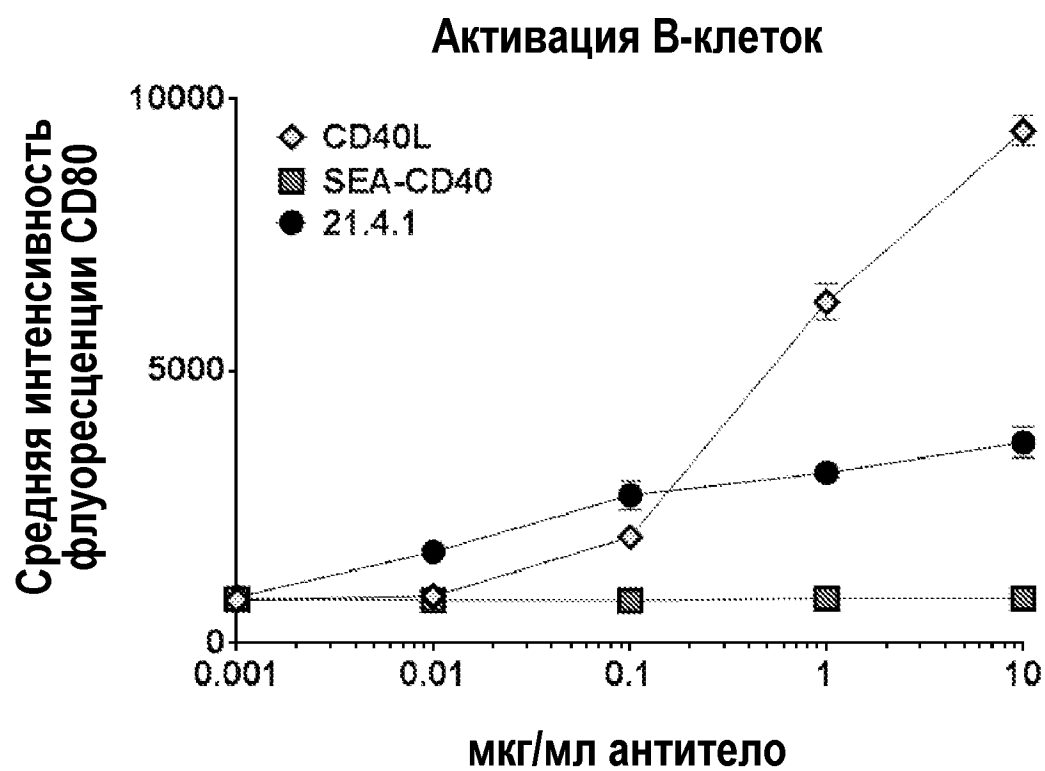
ФИГ. 15В



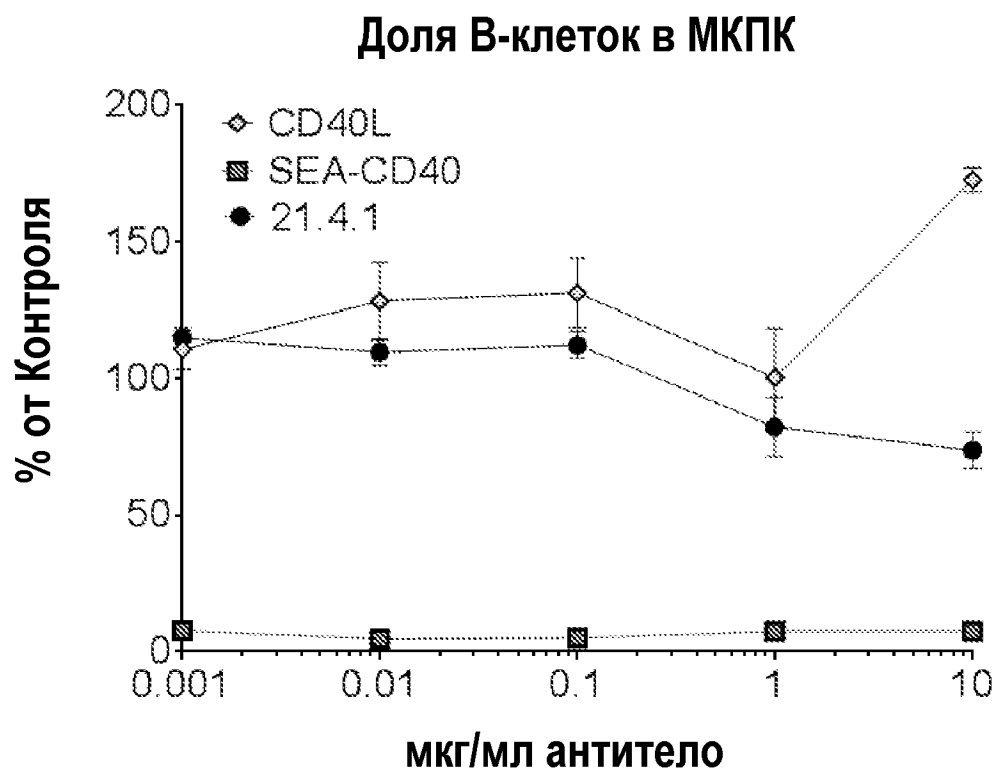
ФИГ. 16



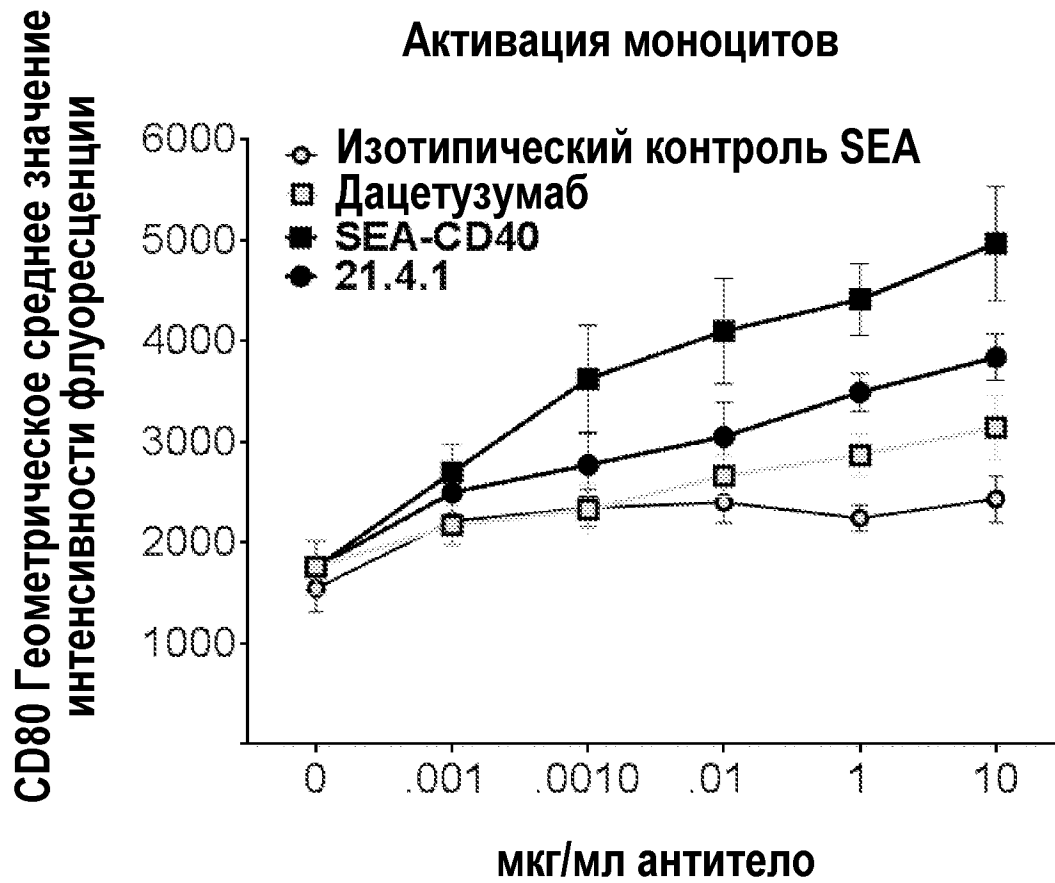
ФИГ. 17



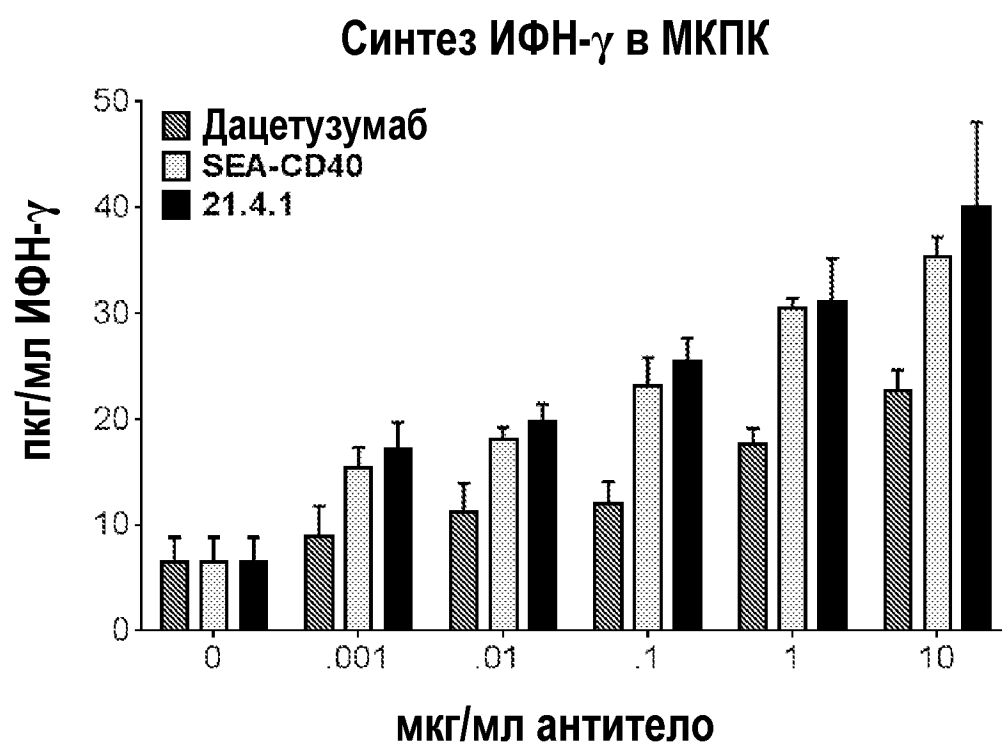
ФИГ. 18



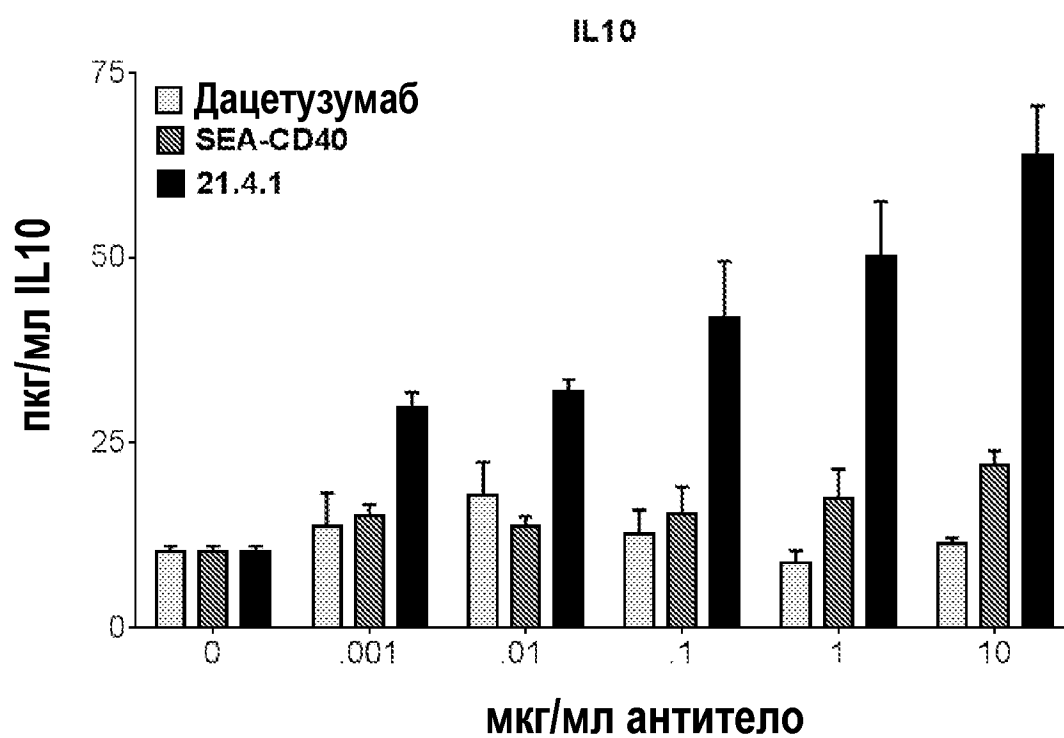
ФИГ. 19



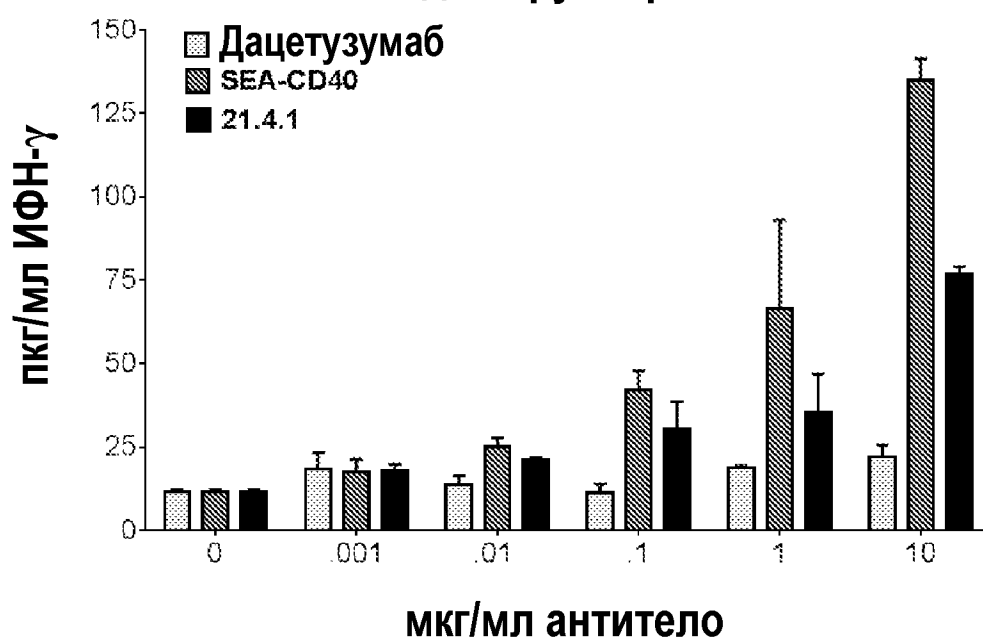
ФИГ. 20



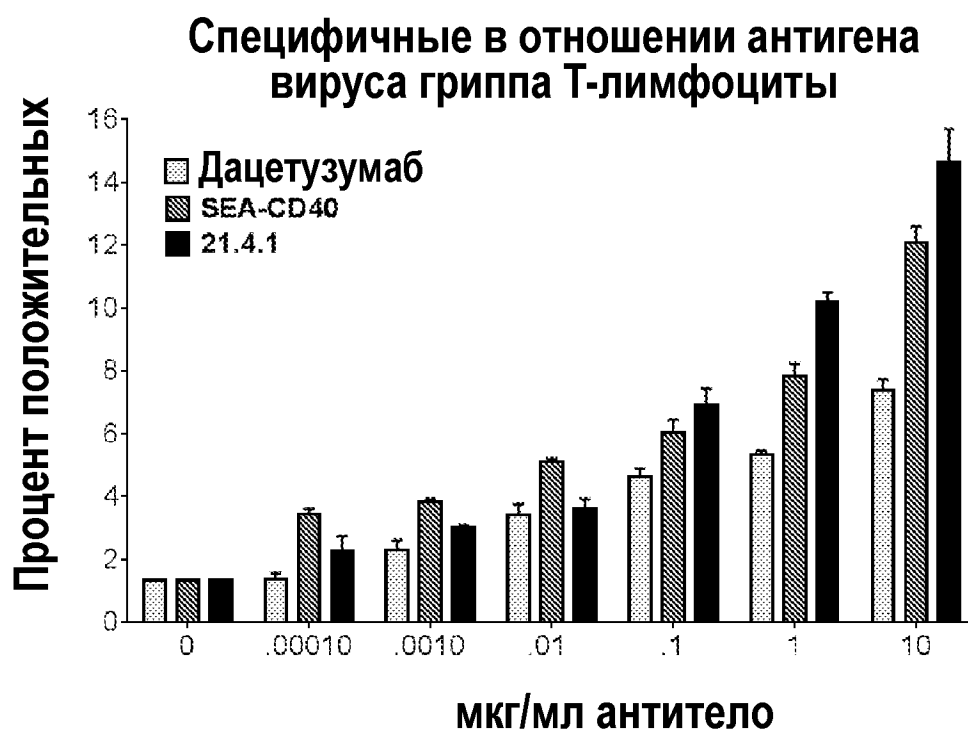
ФИГ. 21



ФИГ. 22

Синтез ИФН- γ в присутствии
пептида вируса гриппа

ФИГ. 23



ФИГ. 24

