

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) **201890175** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2018.06.29

(22) Дата подачи заявки
2016.06.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К CD40**

(31) **62/186,076; 62/252,615**

(32) **2015.06.29; 2015.11.09**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/039754**

(87) **WO 2017/004006 2017.01.05**

(71) Заявитель:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Барнхарт Брайан С., Дево Бригитт,
Ямнюк Аарон П., Окада Шэннон Л.,
Стивенс Бренда Л. (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(57) В настоящем документе предоставлены агонистические антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с CD40 человека. Такие антитела необязательно содержат Fc-области с увеличенной специфичностью к FcγRIIb. Изобретение также относится к способам лечения злокачественной опухоли или хронической инфекции посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму антител по изобретению.

A1

201890175

201890175

A1

АНТИТЕЛА К CD40

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США №№ 62/252615, поданной 9 ноября 2015 года, и 62/186076, поданной 29 июня 2015 года, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Недавние исследования продемонстрировали, что злокачественные опухоли и хронические инфекции человека можно лечить средствами, модулирующими иммунный ответ пациента на злокачественные или инфицированные клетки. См., например, Reck & Paz-Ares (2015) Semin. Oncol. 42:402. Агонистические антитела к CD40, такие как CP-870893 и дацетузумаб (SGN-40), проходили испытания для лечения злокачественной опухоли на основе убеждения, что они могут усиливать такой иммунный ответ. См., например, Kirkwood et al. (2012) CA Cancer J. Clin. 62:309; Vanderheide & Glennie (2013) Clin. Cancer Res. 19:1035. Недавние эксперименты на мышях продемонстрировали, что антитела к CD40 с увеличенной специфичностью к ингибирующему рецептору Fc, FcγRIIb, обладают увеличенной противоопухолевой эффективностью. См., например, WO 2012/087928; Li & Ravetch (2011) Science 333:1030; Li & Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 109:10966; Wilson et al. (2011) Cancer Cell 19:101; White et al. (2011) J. Immunol. 187:1754.

Существует необходимость в улучшенных агонистических антителах к CD40 человека для лечения злокачественных опухолей и хронических инфекций у людей. Такие антитела предпочтительно обладают увеличенной специфичностью к ингибирующему рецептору Fc, FcγRIIb, по сравнению с активирующими рецепторами Fc и демонстрируют увеличенную противоопухолевую и/или антиинфекционную активность.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

По настоящему документу предоставлены выделенные гуманизированные моноклональные антитела мыши, специфически связывающиеся с CD40 человека (зрелая последовательность представлена в SEQ ID NO:1), необязательно содержащие

модифицированные Fc-области, увеличивающие специфичность связывания с рецептором FcγRIIb. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителам к huCD40 или их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за связывание, перекрестно связываются или связываются с тем же эпитопом, что и одно или несколько из антител 12D6 (SEQ ID NO: 3 и 4), 5F11 (SEQ ID NO: 23 и 24), 8E8 (SEQ ID NO: 40 и 41), 5G7 (SEQ ID NO: 52 и 53) и 19G3 (SEQ ID NO: 58 и 59), включая химерные антитела, антитела человека или гуманизированные антитела.

В определенных вариантах осуществления антитела к CD40 человека по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом содержащим или состоящим из одной или нескольких последовательностей, выбранных из группы, состоящей из WGCLLTAVHPEPPTACRE (остатки 11 - 28 SEQ ID NO:1) (антитело 12D6), EPPTACREKQYLINS (остатки 21 - 35 SEQ ID NO:1) (антитела 12D6, 5G7 и 19G3) и ECLPCGESE (остатки 58 - 66 SEQ ID NO:1) (антитело 5F11).

В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а легкая цепь содержит последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, происходящие, по меньшей мере частично, из тех же генных сегментов V-области и генных сегментов J-области зародышевой линии, что и антитела к huCD40 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 или 19G3, как описано в таблице 3. Конкретно, антитело может содержать последовательности CDR, происходящие из тех же зародышевых линий мышей, что и антитело 12D6 (последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-39_01 и зародышевой линии J-области IGHJ4, и последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-110_01 и зародышевой линии J-области IGKJ1), антитело 5F11 (последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-4_02 и зародышевой линии J-области IGHJ3, и последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK3-5_01 и зародышевой линии J-области IGKJ5), антитело 8E8 (последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-80_01 и зародышевой линии J-области IGHJ2, и последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере

частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-110_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2), антитело 5G7 (последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-18_01 и зародышевой линии J-области IGHJ4, и последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK10-96_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2), или антитело 19G3 (последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH5-9-4_01 и зародышевой линии J-области IGHJ3, и последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-117_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2).

В различных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и легкая цепь содержит последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, выбранные из группы, состоящей из: CDR антитела 12D6-03, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:5, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:6; CDR антитела 12D6-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:7, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:9; CDR антитела 12D6-23, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:10, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:11; CDR антитела 12D6-24, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:12, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:9; CDR антитела 5F11-17, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:25, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:26; CDR антитела 5F11-23, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:27, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:28; CDR антитела 5F11-45, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:29, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:30; CDR антитела 8E8-56, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3

содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:42, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:43; CDR антитела 8E8-62, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:44, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:45; CDR антитела 8E8-67, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:46, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:47; CDR антитела 8E8-70, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:48, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:49; CDR антитела 8E8-71, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:50, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:51; CDR антитела 5G7-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-102, соответственно, SEQ ID NO:54, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-34, 50-56 и 89-97, соответственно, SEQ ID NO:55; CDR антитела 5G7-25, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-102, соответственно, SEQ ID NO:56, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-34, 50-56 и 89-97, соответственно, SEQ ID NO:57; CDR антитела 19G3-11, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-101, соответственно, SEQ ID NO:60, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:62; и CDR антитела 19G3-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-101, соответственно, SEQ ID NO:63, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:64.

В различных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен, выбранный из группы, состоящей из 12D6 (остатки 1-119 SEQ ID NO:3), 5F11 (остатки 1-117 SEQ ID NO:23), 8E8 (остатки 1-122 SEQ ID NO:40), 5G7 (остатки 1-113 SEQ ID NO:52) и 19G3 (остатки 1-112 SEQ ID NO:58) с константными областями, содержащими специфичную к FcγRIIb Fc-область, выбранную из группы, состоящей из IgG1f (SEQ ID NO:65), SE (SEQ ID NO:66), SELF (SEQ ID NO:67), P238D (SEQ ID NO:68), V4 (SEQ ID NO:69), V4 D270E (SEQ ID NO:70), V7 (SEQ ID NO:71), V8 (SEQ ID NO:72), V9 (SEQ ID NO:73), V9 D270E (SEQ ID NO:74), V11 (SEQ ID NO:75) и V12 (SEQ ID NO:76).

В определенных вариантах осуществления антитело содержит конкретные переменные домены тяжелых цепей и переменные домены легких цепей, выбранные из группы, состоящей из 12D6-03 (остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно), 12D6-22 (остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9, соответственно), 12D6-23 (остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно), 12D6-24 (остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:9, соответственно), 5F11-17 (остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно), 5F11-23 (остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:28, соответственно), 5F11-45 (остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30), 8E8-56 (остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:42 и SEQ ID NO:43, соответственно), 8E8-62 (остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:44 и SEQ ID NO:45, соответственно), 8E8-67 (остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:47, соответственно), 8E8-70 (остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:48 и SEQ ID NO:49), 8E8-71 (остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, соответственно), 5G7-22 (остатки 1-113 и 1-107 SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:55, соответственно), 5G7-25 (остатки 1-113 и 1-107 SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно), 19G3-11 (остатки 1-112 и 1-112 SEQ ID NO:60 и SEQ ID NO:62, соответственно) и 9G3-22 (остатки 1-112 и 1-112 SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64, соответственно). Любое из этих антител дополнительно может содержать константную область тяжелой цепи, содержащую специфичную к Fc γ RIIb Fc-область, где указанная константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из IgG1f (SEQ ID NO:65), SE (SEQ ID NO:66), SELF (SEQ ID NO:67), P238D (SEQ ID NO:68), V4 (SEQ ID NO:69), V4 D270E (SEQ ID NO:70), V7 (SEQ ID NO:71), V8 (SEQ ID NO:72), V9 (SEQ ID NO:73), V9 D270E (SEQ ID NO:74), V11 (SEQ ID NO:75) и V12 (SEQ ID NO:76). Любое из этих антител дополнительно может содержать константную область легкой цепи каппа SEQ ID NO:77.

В конкретных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает гуманизированное антитело 12D6-24, содержащее легкую цепь SEQ ID NO:9 и тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO:13-22, или гуманизированное антитело 5F11-45, содержащее легкую цепь SEQ ID NO:30 и тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO:31-39. Конкретные антитела включают 12D6-24 SE (SEQ ID NO: 9 и 14), 12D6-24 SELF (SEQ ID NO: 9 и 15), 12D6-24 P238D (SEQ ID NO: 9 и 13), 12D6-24 V4 (SEQ ID NO: 9 и 16), 12D6-24 V4 D270E (SEQ ID NO: 9 и 17), 12D6-24 V8 (SEQ ID NO: 9 и 18), 12D6-24 V9 (SEQ ID NO: 9 и 19), 12D6-24 V9 D270E (SEQ ID NO: 9 и 20), 12D6-24 V11 (SEQ ID

NO: 9 и 21), 12D6-24 V12 (SEQ ID NO: 9 и 22), 5F11-45 SE (SEQ ID NO: 30 и 31), 5F11-45 SELF (SEQ ID NO: 30 и 32), 5F11-45 V4 (SEQ ID NO: 30 и 33), 5F11-45 V4 D270E (SEQ ID NO: 30 и 34), 5F11-45 V8 (SEQ ID NO: 30 и 35), 5F11-45 V9 (SEQ ID NO: 30 и 36), 5F11-45 V9 D270E (SEQ ID NO: 30 и 37), 5F11-45 V11 (SEQ ID NO: 30 и 38) и 5F11-45 V12 (SEQ ID NO: 30 и 39), где последовательности предоставлены для легких и тяжелых цепей, соответственно.

В дополнительных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению содержат тяжелые и легкие цепи обладающие по меньшей мере 80%, 85%, 90% и 95% идентичностью последовательности с последовательностями тяжелых и легких цепей 12D6-24 SE (SEQ ID NO: 9 и 14), 12D6-24 SELF (SEQ ID NO: 9 и 15), 12D6-24 P238D (SEQ ID NO: 9 и 13), 12D6-24 V4 (SEQ ID NO: 9 и 16), 12D6-24 V4 D270E (SEQ ID NO: 9 и 17), 12D6-24 V8 (SEQ ID NO: 9 и 18), 12D6-24 V9 (SEQ ID NO: 9 и 19), 12D6-24 V9 D270E (SEQ ID NO: 9 и 20), 12D6-24 V11 (SEQ ID NO: 9 и 21), 12D6-24 V12 (SEQ ID NO: 9 и 22), 5F11-45 SE (SEQ ID NO: 30 и 31), 5F11-45 SELF (SEQ ID NO: 30 и 32), 5F11-45 V4 (SEQ ID NO: 30 и 33), 5F11-45 V4 D270E (SEQ ID NO: 30 и 34), 5F11-45 V8 (SEQ ID NO: 30 и 35), 5F11-45 V9 (SEQ ID NO: 30 и 36), 5F11-45 V9 D270E (SEQ ID NO: 30 и 37), 5F11-45 V11 (SEQ ID NO: 30 и 38) или 5F11-45 V12 (SEQ ID NO: 30 и 39).

В дополнительных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению содержат тяжелые и легкие цепи по существу состоящие из последовательностей тяжелых и легких цепей 12D6-24 SE (SEQ ID NO: 9 и 14), 12D6-24 SELF (SEQ ID NO: 9 и 15), 12D6-24 P238D (SEQ ID NO: 9 и 13), 12D6-24 V4 (SEQ ID NO: 9 и 16), 12D6-24 V4 D270E (SEQ ID NO: 9 и 17), 12D6-24 V8 (SEQ ID NO: 9 и 18), 12D6-24 V9 (SEQ ID NO: 9 и 19), 12D6-24 V9 D270E (SEQ ID NO: 9 и 20), 12D6-24 V11 (SEQ ID NO: 9 и 21), 12D6-24 V12 (SEQ ID NO: 9 и 22), 5F11-45 SE (SEQ ID NO: 30 и 31), 5F11-45 SELF (SEQ ID NO: 30 и 32), 5F11-45 V4 (SEQ ID NO: 30 и 33), 5F11-45 V4 D270E (SEQ ID NO: 30 и 34), 5F11-45 V8 (SEQ ID NO: 30 и 35), 5F11-45 V9 (SEQ ID NO: 30 и 36), 5F11-45 V9 D270E (SEQ ID NO: 30 и 37), 5F11-45 V11 (SEQ ID NO: 30 и 38) или 5F11-45 V12 (SEQ ID NO: 30 и 39).

В определенных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению, которые содержат варианты последовательностей Fc V4 или V9, дополнительно содержат вариант последовательности D270E. Такие антитела включают гуманизированные 12D6-24 V4 D270E (SEQ ID NO: 9 и 17), 12D6-24 V9 D270E (SEQ ID NO: 9 и 20), 5F11-45 V4 D270E (SEQ ID NO: 30 и 34) и 5F11-45 V9

D270E (SEQ ID NO: 30 и 37), где последовательности предоставлены для легких и тяжелых цепей, соответственно. В альтернативных вариантах осуществления антитела к CD40 человека по настоящему изобретению включают антитела, содержащие тяжелые и легкие цепи, по существу состоящие из последовательностей этих тяжелых и легких цепей или содержащие тяжелые и легкие цепи, обладающие по меньшей мере 80%, 85%, 90% и 95% идентичностью последовательности с этими последовательностями. В определенных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению содержат модифицированные Fc-области с большей специфичностью связывания с FcγRIIb по сравнению со связыванием с активирующими рецепторами, чем антитела с природными Fc-областями. В определенных вариантах осуществления отношение A/I для антитела к huCD40 по настоящему изобретению составляет менее 5, а в предпочтительных вариантах осуществления менее 1.

В определенных вариантах осуществления антитело к huCD40 по настоящему изобретению содержит одну или несколько тяжелых цепей и одну или несколько легких цепей, таких как две тяжелых цепи и две легких цепи.

Настоящее изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим переменные области тяжелых и/или легких цепей антител к CD40 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов, экспрессирующим векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, клеткам, трансформированным экспрессирующими векторами, и способам получения антител посредством экспрессии антител клетками, трансформированными экспрессирующими векторами, и восстановления антител.

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

Настоящее изобретение относится к способу усиления иммунного ответа у индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества антитела к huCD40 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента так, что происходит усиление иммунного ответа у индивидуума. В определенных вариантах осуществления индивидуум поражен опухолью и происходит усиление иммунного ответа против опухоли. В другом варианте осуществления индивидуум поражен вирусной инфекцией, например, хронической вирусной инфекцией и происходит усиление противовирусного иммунного ответа.

Настоящее изобретение также относится к способу подавления роста опухоли у индивидуума, включающему введение индивидууму антитела к huCD40 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента так, что происходит подавление роста опухоли.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения злокачественной опухоли, например, посредством иммунотерапии, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к huCD40 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в виде фармацевтической композиции, таким образом, осуществляя лечение злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки/шейки матки, рак яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстого кишечника, рак почки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, рак половых клеток, злокачественную опухоль кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, неоплазию центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и связанную с вирусом злокачественную опухоль. В определенных вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, не поддающуюся лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

В определенных вариантах осуществления способы модуляции функции иммунной системы и способы лечения, описываемые в настоящем документе, включают введение антитела к huCD40 по настоящему изобретению в комбинации или в качестве биспецифического реагента с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, с антителом к PD1, антителом к PD-L1, антителом к LAG3, антителом к GITR, антителом к OX40, антителом к CD73, антителом к TIGIT, антителом к CD137, антителом к CD27, антителом к CSF-1R, антителом к CTLA-4, агонистом TLR или низкомолекулярным антагонистом IDO или TGF β . В конкретных вариантах осуществления терапевтическое средство против huCD40 комбинируют с терапевтическим средством против PD1 и/или PD-L1, например, лечение антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с PD1 человека, или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые связываются с PD-L1 человека.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена последовательность константного домена IgG1f человека (SEQ ID NO:65), пронумерованного 118-446 для лучшей иллюстрации вариантов последовательностей Fc, описываемых в настоящем документе (таблица 4). Остатки, являющиеся объектом варьирования, приведены полужирным шрифтом, а измененная аминокислота приведена полужирным шрифтом ниже остатка. Замена D270E подчеркнута. С-концевой остаток лизина (K) на фиг. 1 и в SEQ ID NO:65, а также во всех других последовательностях тяжелых цепей и константных доменах тяжелых цепей, описанных в списке последовательностей, удален. Однако в других вариантах осуществления, особенно конструкциях нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелые цепи и константные домены тяжелых цепей антител к huCD40 по настоящему изобретению, эти последовательности содержат дополнительный остаток лизина на С-конце белка или нуклеотиды, кодирующие дополнительный лизин, на 3'-конце нуклеиновой кислоты.

Фиг. 2 представляет собой диаграмма Венна, иллюстрирующая эпитопные группы ("выборки") на CD40 человека, связываемого антителами по настоящему изобретению, а также блокирование связывания CD40L. Антитела с перекрывающимися овалами или окружностями конкурируют за связывание с CD40 человека, а антитела, попадающие в прямоугольник, блокируют связывание CD40L с CD40 человека.

Фиг. 3А и 3В демонстрируют активацию дендритных клеток, как определяют по секреции IL-6 под действием агонистических антител к CD40, как функцию последовательности Fc. См. пример 7. Конструировали ряд антител, содержащих переменный домен mAb 12D6-24 и различные константные области IgG1f человека, включая варианты IgG1f, SE, SELF, P238D, V4, V8, V9 и V12. На фиг. 3А предоставлены данные, полученные с использованием клеток одного донора, а на фиг. 3В предоставлены данные, полученные с использованием клеток другого донора.

На фиг. 4 представлена активация клеток, как определяют по CD54 клеточной поверхности, под действием агонистических антител к CD40, как функцию последовательности переменного домена. См. пример 7. Конструировали ряд антител, содержащих константную область IgG1f-V12 человека и переменные домены из исходных mAb (мыши) к CD40 12D6, 5G7, 8E8, 19G3 и 5F11. Результаты нанесены на

график в виде медианной интенсивности флуоресценции (MFI) как функции концентрации антитела.

На фиг. 5 представлен процент $Fc\gamma R$, связываемого различными антителами по настоящему изобретению, включая антитела с заменами по D270. См. пример 8. Названия антител, содержащие "-суп.", представляют собой супернатанты продуцирующих антитела клеток, тогда как другие представляют собой очищенные антитела. Данные предоставлены в виде значения процентов максимального связывания рецепторов для каждой комбинации антитела и рецептора, как определяют в системе ForteBio Octet. См., например, пример 3. Каждая группа из трех столбцов представляет, слева направо, связывание с $hCD32a/Fc\gamma RIIa-H131$ (10 мкМ) (заштрихованные столбцы), $hCD32b/Fc\gamma RIIa-R131$ (10 мкМ) (черные столбцы) и $hCD32b/Fc\gamma RIIf$ (1 мкМ) (белые столбцы).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, конкретно, моноклональным антителам, например, гуманизированным или моноклональным антителам человека, которые специфически связываются с CD40 человека ("huCD40") и обладают агонистической активностью. Предоставлены последовательности различных гуманизированных моноклональных антител мыши к huCD40. В определенных вариантах осуществления антитела, описываемые в настоящем документе, происходят из конкретных последовательностей зародышевых линий тяжелых и легких цепей мыши и/или содержат конкретные структурные отличительные признаки, такие как области CDR, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. В других вариантах осуществления антитела конкурируют за связывание с CD40 с антителами к CD40 или связываются с тем же эпитопом как антитела к CD40, для которых предоставлены последовательности в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления последовательность Fc-области тяжелой цепи модифицирована так, чтобы специфически усиливать связывание с $Fc\gamma RIIf$.

Кроме того, по настоящему документу предоставлены способы получения таких антител, иммуноконъюгатов и биспецифических молекул, содержащих такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтических композиций, формулируемых с содержанием этих антител или фрагментов. Также по настоящему документу предоставлены способы применения антител для усиления иммунного

ответа, отдельно или в комбинации с другими иммуностимулирующими средствами (например, антителами) и/или терапевтическими средствами против злокачественных опухолей или инфекций. Таким образом, антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно использовать при лечении в широком спектре терапевтических применений, включая, например, ингибирование роста опухоли и лечение хронических вирусных инфекций.

Определения

Для облегчения понимания настоящего описания сначала определены некоторые термины. В ходе подробного описания приведены дополнительные определения.

CD40 относится к "представителю 5 суперсемейства рецепторов TNF" (TNFRSF5). Если не указано иначе или понятно из контекста, указание CD40 в настоящем документе относится к CD40 человека ("huCD40"), и антитела к CD40 относятся к антителам к CD40 человека. CD40 человека дополнительно описан в GENE ID NO: 958 и MIM (Mendelian Inheritance in Man): 109535. Последовательность CD40 человека (NP_001241.1), включая сигнальную последовательность из 20 аминокислот, приведена в SEQ ID NO:1.

CD40 взаимодействует с лигандом CD40 (CD40L), который также обозначают как TNFRSF5, gp39 и CD154. Если не указано иначе или понятно из контекста, указания CD40L в настоящем документе относятся к CD40L человека ("huCD40L"). CD40L человека дополнительно описан в ГЕН ID NO: 959 и MIM: 300386. Последовательность CD40L человека (NP_000065.1) приведена в SEQ ID NO:2.

Если не указано иначе или понятно из контекста, термин "антитело", как его используют в настоящем документе, может включать целые антитела и их любые антигенсвязывающие фрагменты (например, "антигенсвязывающие части") или отдельные цепи. В одном из вариантов осуществления "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, связанных друг с другом дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающему фрагменту. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращаемой в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. В определенных природных антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В определенных природных антителах каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращаемой в настоящем документе как V_L) и константной

области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередуемые с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая из V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех каркасных областей (FR), располагающихся от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[0001] Как правило, антитела связываются с распознаваемыми ими антигенами специфически с высокой аффинностью, отражаемой константой диссоциации (K_D) 10^{-7} - 10^{-11} М или менее. Любую K_D , большую чем приблизительно 10^{-6} М, как правило, рассматривают как указывающую на неспецифическое связывание. Как используют в настоящем документе, антитело которое "специфически связывается" с антигеном относится к антителу, которое связывается с антигеном и по существу идентично антигенам с высокой аффинностью, что означает связывание с K_D 10^{-7} М или менее, предпочтительно 10^{-8} М или менее, даже более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, и наиболее предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-10} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген "по существу идентичен" данному антигену, если он демонстрирует высокую степень идентичности последовательности с данным антигеном, например, если он демонстрирует по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, или даже более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичности последовательности с последовательностью данного антигена. В качестве примера, антитело которое специфически связывается с CD40 человека, также может перекрестно реагировать с CD40 определенных не являющихся человеком видов приматов (например, яванского макака), но не может перекрестно реагировать с CD40 других видов или с антигеном, отличным от CD40.

Если не указано иначе, иммуноглобулины могут формировать любой из общеизвестных изотипов, включая в качестве неограничивающих примеров IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG у определенных видов разделяют на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей.

Иммуноглобулины, например, IgG1 человека, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Если не указано иначе, антитела по настоящему изобретению содержат константный домен IgG1f (SEQ ID NO:65). Если не указано иначе, "антитела" могут включать, в качестве примера, моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; антитела человека и не принадлежащие человеку антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела.

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

В изобретение также включены конструкции одноцепочечных антител. Хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируют разные гены, их рекомбинантными способами можно связать синтетическим линкером, который позволяет им образовать одну белковую цепь, в которой области V_L и V_H спариваются с формированием одновалентной молекулы, известной как одноцепочечный Fv (scFv); см. например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Полагают, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин "антигенсвязывающие часть/фрагмент" антитела. Эти и другие возможные конструкции описаны в Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301. Эти фрагменты антител получают общепринятыми способами, известными специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность таким же способам, как интактные антитела. Антигенсвязывающие части/фрагменты можно получать

посредством технологий рекомбинантных ДНК или посредством ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Если не указано иначе, слово "фрагмент", когда его используют в отношении антитела, так как в формуле изобретения, относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела так, что "антитело или фрагмент" имеют то же значение, что и "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент".

"Биспецифическое" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело с двумя различными парами тяжелых/легких цепей, что обеспечивает два антигенсвязывающих участка со специфичностью к различным антигенам. Биспецифические антитела можно получать рядом способов, включая слияние гибридом или связывание фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148, 1547-1553.

Как используют в настоящем документе, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу, или к композиции антител, в которой все антитела демонстрируют единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Как правило, такие моноклональные антитела происходят из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и их воспроизводят без преднамеренного проведения каких-либо изменений последовательностей. Таким образом, термин "моноклональное антитело человека" относится к моноклональному антителу, содержащему вариabельные и необязательные константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном из вариантов осуществления моноклональные антитела человека получают посредством гибридомы, например, получают посредством слияния В-клетки, получаемой у трансгенного или трансхромосомного не являющегося человеком животного (например, трансгенной мыши с геномом, содержащим трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека) с иммортализованной клеткой.

Как используют в настоящем документе, термин "рекомбинантное антитело человека" включает все антитела человека, которые производят, экспрессируют, получают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (а) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулинов человека, или из гибридомы,

полученной от него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антител, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, произведенные, экспрессированные, полученные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, в которых используют конкретные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают последующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, при созревании антитела. Как известно в данной области (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируют разные гены, которые перегруппировываются с формированием антитела, специфичного к чужеродному антигену. В дополнение к перестановке переменная область может дополнительно подвергаться модификациям посредством нескольких одиночных замен аминокислот (обозначаемых как соматическая мутация или гипермутация) с увеличением аффинности антитела к чужеродному антигену. При дальнейшем ответе на антиген изменяется константная область (т.е., происходит переключение изотипа). Таким образом, последовательности нуклеиновой кислоты с перестановками и соматическими мутациями, которые кодируют полипептиды легких цепей и тяжелых цепей иммуноглобулинов в ответ на антиген, могут не являться идентичными исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого быть по существу идентичными или сходными (например, по меньшей мере на 80% идентичными).

Антитело "человека" (HuMAb) относится к антителу с переменными областями, в которых каркасные области и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вносимые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако, как используют в настоящем документе, термин "антитело человека" не предназначен для

включения антител, в которых на каркасные последовательности человека привиты последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь. Термины антитела "человека" и "полностью принадлежащие человеку" антитела используют как синонимы.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, у которого определенные, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR не принадлежащего человеку антитела, например, антитела мыши, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. В одном из вариантов осуществления гуманизированной формы антитела определенные, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как определенные, большинство или все аминокислоты в одной или нескольких областях CDR остаются неизменными. Допустимы небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислоты при условии, что они не устраняют способность антитела к связыванию конкретного антигена. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную со специфичностью исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области происходят из одного вида, а константные области происходят из другого вида, такому как антитело, в котором переменные области происходят из антитела мыши, а константные области происходят из антитела человека. "Гибридное" антитело относится к антителу с тяжелыми и легкими цепями различных типов, такими как тяжелая цепь мыши (исходная) и гуманизированная легкая цепь или наоборот.

Как используют в настоящем документе, "изотип" относится к классу антитела (например, антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируют гены константных областей тяжелых цепей.

"Аллотип" относится к природным вариантам в конкретной изотипической группе, где эти варианты отличаются одной или несколькими аминокислотами. См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1.

Фразы "распознающее антиген антитело" и "специфичное к антигену антитело" используют в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Как используют в настоящем документе, "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других антител с другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается

с CD40 по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD40). Однако, выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом CD40, может перекрестно реагировать с другими белками CD40 других видов.

"Эффекторные функции", являющиеся результатом взаимодействия Fc-области антитела с определенными рецепторами Fc, включают, но не обязательно ограничены, связывание с C1q, обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC), связывание рецептора Fc, опосредуемые Fc γ R эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый опосредуемый клетками фагоцитоз (ADCP) и снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR). Как правило, для таких эффекторных функций необходима комбинация Fc-области с антигенсвязывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела).

"Рецептор Fc" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают рецепторы семейства Fc γ R, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство Fc γ R состоит из трех активирующих (Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII у мышей; Fc γ RIA, Fc γ RIIA и Fc γ RIIA у людей) и одного ингибирующего (Fc γ RIIb или, эквивалентно, Fc γ RIIB) рецепторов. Различные свойства Fc γ R человека обобщены в таблице 1. Большинство врожденных типов эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих Fc γ R и ингибирующий Fc γ RIIb, тогда как естественные киллерные (NK) клетки селективно экспрессируют один активирующий рецептор Fc (Fc γ RIII у мышей и Fc γ RIIA у людей), но не ингибирующий Fc γ RIIb ни у мышей, ни у людей. IgG1 человека связывается с большинством рецепторов Fc человека и считается эквивалентом IgG2a мыши в отношении типов активирующих рецепторов Fc, с которыми оно связывается.

ТАБЛИЦА 1

Свойства Fc γ R человека

с γ	Аллельные варианты	Аффинность к IgG человека	Предпочтение изотипов	Распределение в клетках
с γ RI	один описанный	Высокая (K _D $\approx$ 10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
с γ RIIA	131	От низкой до средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
с γ RIIA	158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
с γ RIIb	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Fc-область" (область кристаллизующегося фрагмента) или "Fc-домен" или "Fc" относится к С-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, исключая область первого константного домена иммуноглобулина (например, C_H1 или C_L). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит константные домены C_H2 и C_H3 в каждой из двух тяжелых цепей антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C_H2-4) в каждой полипептидной цепи. У IgG Fc-область содержит домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 и шарнир между C γ 1 и C γ 2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяют

как расположенную от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до С-конца тяжелой цепи, где нумерацию осуществляют по индексу EU как у Kabat. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD; фигуры 3с-3f патентной публикации США № 2008/0248028. Домен C_H2 Fc-области IgG человека расположен приблизительно от аминокислоты 231 приблизительно до аминокислоты 340, тогда как домен C_H3 находится в Fc-области с С-концевой стороны домена C_H2, например, он расположен приблизительно от аминокислоты 341 приблизительно до аминокислоты 447 IgG (включая С-концевой лизин). Как используют в настоящем документе, Fc-область может представлять собой Fc с нативной последовательностью, включая любой аллотипический вариант или вариант Fc (например, неприродный Fc). Также Fc может относиться к этой области отдельно или в рамках содержащего Fc белка, такого как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также обозначаемый как "слитый с Fc белок" (например, антитело или иммуноадгезин).

"Fc-область с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности Fc-области, существующей в природе. Fc-области человека с нативными последовательностями включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их природные варианты. Fc с нативными последовательностями включают различные аллотипы Fc. См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к участку на антигене (например, huCD40), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в белковых антигенах могут формироваться из смежных аминокислот (как правило, линейный эпитоп) или несмежных аминокислот, располагающихся вследствие третичной укладки белка (как правило, конформационный эпитоп). Эпитопы, формируемые смежными аминокислотами, как правило, но не всегда, сохраняются после воздействия денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, формируемые при третичной укладке, как правило, при обработке денатурирующими растворителями теряются. Как правило, эпитоп содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин "картирование эпитопов" относится к способу идентификации молекулярных детерминант на антигене, вовлеченных в распознавание антитело-антиген. Способы определения того, какие эпитопы связываются с данным антителом, хорошо известны в данной области и включают, например, анализы иммуноблоттинг и иммунопреципитация, где перекрывающиеся или смежные пептиды из (например, из CD40) тестируют на реакционную способность с данным антителом (например, антителом к CD40); рентгеноструктурную кристаллографию; 2-мерный ядерный магнитный резонанс; дрожжевой дисплей (см. пример 6) и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)) (см. пример 5).

Термин "связывается с тем же эпитопом" в отношении двух или более антител означает, что антитела связываются с одним и тем же участком аминокислотных остатков, как определяют данным способом. Способы определения связывания антител с "тем же эпитопом на CD40" что и антитела, описываемые в настоящем документе, включают, например, способы картирование эпитопов, такие как, анализы кристаллов комплексов антиген:антитело в рентгеновских лучах, что обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). В других способах осуществляют мониторинг связывания антитела с фрагментами антигена (например, протеолитическими фрагментами) или с мутированными вариантами антигена, где потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто рассматривают как показатель компонента эпитопа, например, сканирующий аланином мутагенез (Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081) или дрожжевой дисплей мутантных вариантов последовательностей-мишеней (см. пример 6). Кроме того, также можно использовать компьютерные комбинаторные способы картирования эпитопов. Эти способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Ожидают, что антитела с одинаковыми или очень сходными V_H и V_L или с одинаковыми последовательностями CDR будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, например, ингибирует ли и до какой степени одно антитело

связывание другого антитела с мишенью, можно определять с использованием известных экспериментов по конкуренции. В определенных вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. В зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом", уровень ингибирования или конкуренции может отличаться (например, холодов антитело, которое сначала инкубируют с мишенью). Анализы конкуренции можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc.; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с тем же эпитопом, перекрывающимися эпитопами или со смежными эпитопами (например, что является из стерического препятствия).

Другие анализы конкурентного связывания включают: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (см. Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614); твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с меткой с использованием метки I-125 (см. Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546); и прямой RIA с меткой (Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77).

Как используют в настоящем документе, термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается", относятся к связыванию антитела с эпитопом на predetermined антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D) приблизительно менее 10^{-7} M, например, приблизительно менее 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или даже менее, при определении, например, посредством технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в устройстве для поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием predetermined антигена, например, рекомбинантного CD40 человека, в качестве анализируемого вещества, и антитела в качестве лиганда, или анализа Скэтчарда связывания антитела с антиген-положительными клетками, и (ii) связывается с

предопределенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предопределенного антигена или очень сходного антигена. Таким образом, антитело, которое "специфически связывается с CD40 человека" относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клеткой CD40 человека с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже менее. Антитело, которое "перекрестно реагирует с CD40 яванского макака", относится к антителу, которое связывается с CD40 яванского макака с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже менее.

Как используют в настоящем документе, термин " $k_{ассоц.}$ " или " k_a " относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " $k_{дисс.}$ " или " k_d ", как используют в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как используют в настоящем документе, термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из отношения k_d и k_a (например, k_d/k_a) и выражается как молярная концентрация (М). Значения K_D для антитела можно определять способами, хорошо известными в данной области. Предпочтительные способы определения K_D антитела представляют собой анализ интерферометрии биослоев (BLI), предпочтительно с использованием устройства ForteBio Octet RED (см. пример 3), поверхностно плазмонный резонанс, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (см. пример 4) или проточную цитометрию и анализ Скэтчарда.

Термин " EC_{50} " в рамках анализа с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vitro* или *in vivo* относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т.е., половину между максимальным ответом и исходным уровнем.

Термин "связывается с иммобилизованным CD40" относится к способности антитела, описываемого в настоящем документе, связываться с CD40, например, экспрессируемым на поверхности клетки или связанным с твердой подложкой.

Как используют в настоящем документе, термин "перекрестно реагирует" относится к способности антитела, описываемого в настоящем документе, связываться с CD40 других видов. Например, антитело, описываемое в настоящем документе,

которое связывается с CD40 человека, также может связываться с CD40 других видов (например, CD40 яванского макака). Как используют в настоящем документе, перекрестную реактивность можно определять посредством детекции специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания или другого функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими CD40. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием устройства SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), или способов проточной цитометрии.

Как используют в настоящем документе, термин "природный", как его применяют к объекту, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которую можно выделять из источника в природе и которая целенаправленно не модифицирована в лаборатории человеком, является природной.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут быть подвергнуты модификациям, в качестве неограничивающих примеров, таким как, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Как используют в настоящем документе, термин "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может являться одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также предоставлены "консервативные модификации последовательности" предоставленной по настоящему документу последовательности антитела, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не устраняют связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью, или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Например, модификации можно проводить стандартными способами, известными в данной области, такими как сайт-специфический мутагенез и опосредуемый ПЦР мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают консервативные

аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. В данной области определены семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, теоретически рассчитанный несущественный аминокислотный остаток в антителе к CD40 предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области. См., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997).

Альтернативно, в другом варианте осуществления, во всей или в части кодирующей последовательности антитела к CD40 можно случайным образом вносить мутации, например, посредством насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела к CD40 можно подвергать скринингу на улучшенную активность связывания.

В отношении нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" означает, что две нуклеиновые кислоты или их указанные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов по меньшей мере приблизительно по 80% нуклеотидов, как правило, по меньшей мере приблизительно от 90% до 95%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно от 98% до 99,5% нуклеотидов. Альтернативно, существенная гомология существует, когда участки в селективных условиях гибридизации гибридизуются с комплементарной цепью.

В отношении полипептидов термин "существенная гомология" означает, что два полипептида или их указанные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными с соответствующими вставками или делециями аминокислот по меньшей мере приблизительно по 80% аминокислот, как правило, по

меньшей мере приблизительно от 90% до 95%, а более предпочтительно по меньшей мере приблизительно от 98% до 99,5% аминокислот.

Процент идентичности двух последовательностей представляет собой функцию количества идентичных положений в последовательностях при оптимальном выравнивании последовательностей (например, % гомологии = кол-во идентичных положений/общее кол-во положений $\times$ 100), где оптимальное выравнивание определяют, учитывая количество пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно проводить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей можно определять с использованием программы GAP пакета программного обеспечения GCG, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP, и штрафа за создание пропуска 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продление пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно также определять с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который встроен в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продление пропуска 12 и штраф за создание пропуска 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с использованием алгоритма Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который встроен в программу GAP пакета программного обеспечения GCG, с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, и штрафа за создание пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продление пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и белков, описываемые в настоящем документе, можно дополнительно использовать в качестве "искомой последовательности" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск BLAST нуклеотидов можно проводить с использованием программы NBLAST, показатель = 100, длина слова = 12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, описываемым в настоящем документе. Поиск BLAST белков

можно проводить с использованием программы XBLAST, показатель = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулы белков описываем в настоящем документе. Для получения выравниваний с пропусками с целями сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Нуклеиновые кислоты могут находиться в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу в очищенной форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "очищенной по существу до чистоты", когда ее очищают от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, стандартными способами, включая обработку щелочами/SDS, разделение в CsCl, хроматография на колонке, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области способы. См. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Как используют в настоящем документе, термин "вектор" предназначен для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, способной к транспортировке другой нуклеиновой кислоты с которой она лигирована. Один из типов векторов представляет собой "плазмиду", которая означает замкнутую кольцевую двухцепочечную ДНК, в которую можно лигировать дополнительные участки ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные участки ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы с бактериальным участком начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) при введении в клетку-хозяина могут интегрироваться в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны контролировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). Как правило, экспрессирующие векторы, пригодные в технологиях рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании, "плазида" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо так как плазида является наиболее широко используемой формой

вектора. Однако также включены другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Как используют в настоящем документе, термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в этой клетке, и может представлять собой клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только отдельной конкретной клетки, но также и потомства такой клетки. Так как, вследствие мутации или воздействия окружающей среды в последующих поколениях могут происходить определенные модификации, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но его все еще включают в объем термина "клетка-хозяин", как его используют в настоящем документе.

"Иммунный ответ" относится к биологическому ответу позвоночных против чужеродных агентов, который защищает организм от этих агентов и обуславливаемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредован действием клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В лимфоцитов, естественных киллерных (NK) клеток, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток или нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному направленному воздействию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма млекопитающего инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунный ответ включает, например, активацию или ингибирование Т-клеток, например, эффекторных Т-клеток или Th клеток, таких как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетка, или ингибированию или удалению T_{reg} клеток. "Эффекторные Т-клетки" ("Т_{эфф}") относится к Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также к хелперным Т-клеткам (Th) клеткам, которые секретируют цитокины и активируют и контролируют другие иммунocyты, но не включает регуляторные Т-клетки (T_{reg} клетки).

Как используют в настоящем документе, термин "опосредуемый Т-клетками ответ" относится к ответу, опосредуемому Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки

(например, CD8⁺-клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4⁺-клетки). Опосредуемый Т-клетками ответ включает, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

Как используют в настоящем документе, термин "ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунному ответу, индуцируемому цитотоксическими Т-клетками. Ответ CTL преимущественно опосредован CD8⁺ Т-клетками.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например, компоненту пути передачи сигнала, которое может участвовать в модуляции, регуляции или модификации иммунного ответа. "Модуляция", "регуляция" или "модификация" иммунного ответа относится к любому изменению клетки иммунной системы или активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает стимуляцию или подавление иммунной системы, что может проявляться увеличением или уменьшением количества различных типов клеток, увеличением или уменьшением активности этих клеток или другими изменениями, которые могут происходить в иммунной системе. Выявлены ингибирующие и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут усиленно функционировать в микроокружении опухоли. В предпочтительных вариантах осуществления иммуномодулятор находится на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегулирующая мишень" представляет собой иммуномодулятор, который является мишенью для связывания, и активность которого изменяется при связывании вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают, например, рецепторы на поверхностях клеток ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодулирующие лиганды").

"Иммунотерапия" относится к лечению индивидуума, пораженного, или подверженного риску возникновения, или страдающего рецидивом заболевания, способом, включающим индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунного ответа.

"Иммуностимулирующая терапия" относится к лечению, которое приводит к усилению (индукции или повышению) иммунного ответа у индивидуума, например, для лечения злокачественной опухоли.

"Потенцирование эндогенного иммунного ответа" означает увеличение эффективности или активности существующего иммунного ответа у индивидуума. Этого увеличения эффективности и активности можно достигать, например,

посредством преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина или посредством стимулирующих механизмов, которые повышают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Как используют в настоящем документе, термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может являться ковалентной или нековалентной. Связь также может являться генетической (например, рекомбинантно слитые молекулы). Такие связи можно осуществлять с использованием широкого спектра принятых в данной области способов, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантных белков.

Как используют в настоящем документе, "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, индивидууму с использованием любых из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Предпочтительные маршруты введения антител, описываемых в настоящем документе, включают внутривенный, интраперитонеальный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные маршруты введения, например, посредством инъекции или инфузии. Как используют в настоящем документе, фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, посредством инъекции, и в качестве неограничивающих примеров включает внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, внутрикапсулярную, внутриглазную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, антитело, описываемое в настоящем документе, можно вводить посредством непарентерального маршрута, например, местного, эпидермального или слизистого маршрута введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно проводить, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

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

Как используют в настоящем документе, "злокачественная опухоль" относится к широкой группе заболеваний, характеризующих неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может приводить к формированию злокачественных опухолей или клеток, которые прорастают в близлежащие ткани и могут метастазировать в дистальные отделы организма по лимфатической системе или кровотоку.

Как используют в настоящем документе, термины "лечить" и "лечение" относятся к любому виду вмешательства или способов, проводимых у индивидуума, или к введению ему активного средства с целью реверсии, облегчения, улучшения, подавления или замедления или предотвращения прогрессирования, развития, увеличения тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. Профилактика относится к введению индивидууму, у которого не выявлено заболевание, для предотвращения начала заболевания или минимизации его эффектов, если оно начнется.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определен как количество, достаточной для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого действия. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, способствует регрессу заболевания, признаком чего являются снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и длительности периодов без проявления симптомов заболевания, или предотвращает ухудшение или инвалидизацию вследствие заболевания. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная дозировка" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством индивидууму с риском развития заболевания или рецидива заболевания подавляет развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства обеспечивать регресс заболевания или подавлять развитие или рецидивирование заболевания можно оценивать с использованием ряда способов, известных практикующему специалисту, таких как в течение клинических испытаний у людей, в системах моделей на животных, позволяющих прогнозировать эффективность у людей, или оценивая активность средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера средство против злокачественных опухолей представляет собой лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование злокачественной опухоли или обеспечивает регресс злокачественной опухоли у индивидуума. В предпочтительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства обеспечивает регресс злокачественной опухоли до момента устранения злокачественной опухоли. "Обеспечение регресса злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с антинеопластическим средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и длительности периодов без проявления симптомов заболевания, предотвращению ухудшения или инвалидизации вследствие заболевания или иное снижение интенсивности симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства обеспечивать регресс злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к допустимо низкому уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном, органном и/или организменном уровне (неблагоприятных эффектов), являющихся результатом введения лекарственного средства.

В качестве примера, для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно индивидуумов, не проходивших лечения. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество или доза лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, например, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценивать с использованием анализов, описанных ниже. Ингибирование роста опухоли может происходить не сразу после лечения, а может происходить только через определенный период времени или после повторного введения. Альтернативно, это свойство композиции можно оценивать посредством изучения способности соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование можно измерять *in vitro* посредством анализов, известных практикующему специалисту. В других предпочтительных

вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, регресс опухоли можно наблюдать и он может продолжаться в течение периода по меньшей мере приблизительно 20 суток, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 суток или даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 суток.

Как используют в настоящем документе, термин "комбинационная" терапия, если иное не понятно из контекста, предназначен для включения согласованного введения двух или более терапевтических средств, и в качестве неограничивающих примеров включает одновременное дозирование. Конкретно, комбинированное лечение включает совместное введение (например, введение совместного состава или одновременное введение отдельных терапевтических композиций) и серийное или последовательное введение, при условии, что введение одного терапевтического средства определенным образом обусловлено введением другого терапевтического средства. Например, одно терапевтическое средство можно вводить только после введения другого терапевтического средства и обеспечения его действия в течение предписанного периода времени. См., например, Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423.

Термины "пациент" и "индивидуум" относятся к любому человеку, которому проводят профилактическое или терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описываемые в настоящем документе, можно использовать для лечения индивидуума со злокачественной опухолью.

В приводимых ниже подразделах различные аспекты, описываемые в настоящем документе, описаны более подробно.

I. Антитела к CD40

В настоящей заявке описаны агонистические антитела к huCD40 с требуемыми для применения в качестве терапевтических средств при лечении заболеваний, таких как злокачественные опухоли, свойствами. Эти свойства включают одно или несколько из способности с высокой аффинностью связываться с CD40 человека, приемлемо низкой иммуногенности у людей, способности предпочтительно связываться с FcγRIIb и отсутствия подвижностей последовательности, которые могут снизить химическую стабильность антитела.

Антитела к CD40, описываемые в настоящем документе посредством последовательности, связываются со специфическими эпитопами на CD40 человека, как можно определять, как описано в примерах 5 и 6. Другие антитела, которые связываются с теми же или близкородственными эпитопами, вероятно также могут

обладать этими требуемыми свойствами, и их можно выявлять, проводя эксперименты по конкурентному связыванию.

Антитела к huCD40, которые конкурируют с антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе

Антитела к huCD40, которые конкурируют с антителами по настоящему изобретению за связывание с huCD40, можно индуцировать с использованием протоколов иммунизации, сходных с протоколами иммунизации, описываемыми в настоящем документе (примеры 1 и 2). Антитела, которые конкурируют за связывание с антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе посредством последовательности, также можно получать посредством иммунизации мышей или других не являющихся человеком животных посредством CD40 человека или конструкции, содержащей его внеклеточный домен (остатки 21-193 SEQ ID NO:1), или посредством иммунизации фрагментом CD40 человека, содержащим эпитоп, связываемый антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе. Получаемые антитела можно подвергать скринингу на способность блокировать связывание 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 и/или 19G3 с CD40 человека хорошо известными в данной области способами, например, блокирование связывания со слитым белком из внеклеточного домена CD40 и домена Fc иммуноглобулина в ELISA, или блокировать способность связываться с клетками, экспрессирующими на своей поверхности huCD40, например, посредством FACS. В различных вариантах осуществления тестируемое антитело до, одновременно или после добавления 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 или 19G3 приводят в контакт со слитым белком CD40-Fc (или с клетками, экспрессирующими на своей поверхности huCD40). Например, можно проводить эксперименты по "сортировке" (пример 4) с определением попадает ли тестируемое антитело в одну "выборку" с антителами, описываемыми в настоящем документе посредством последовательности, с антителами, описываемыми в настоящем документе посредством последовательности в виде "контрольных" антител, и антителами, тестируемыми в качестве "тестируемых" антител. Антитела, которые уменьшают связывание антител, описываемых в настоящем документе посредством последовательности, с CD40 человека (в виде слияния с Fc или на клетке), особенно приблизительно в стехиометрических концентрациях, вероятно связывают тот же, перекрывающийся или расположенный по соседству эпитопы и, таким образом, также могут обладать требуемыми функциональными свойствами 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 или 19G3.

Таким образом, по настоящему документу предоставлены антитела к huCD40, которые ингибируют связывание антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, с huCD40 на клетках по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, и/или связывание которых с huCD40 на клетках ингибируют антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, например, как определяют посредством ELISA или FACS, например, с использованием анализа, описанного в следующем абзаце.

Иллюстративный эксперимент по конкурированию для определения блокирования тестируемым антителом связывания с (например, "конкуренции с") контрольным антителом, можно проводить следующим образом: клетки, экспрессирующие CD40, высевает в 96-луночный планшет с 10^5 клеток на лунку с образцом. Планшет помещают на лед с последующим добавлением неконъюгированного тестируемого антитела в концентрациях в диапазоне от 0 до 50 мкг/мл (трехкратное титрование, начиная с наибольшей концентрации 50 мкг/мл). В качестве изотипического контроля первого антитела можно использовать постороннее IgG и добавлять его в тех же концентрациях (трехкратное титрование, начиная с наибольшей концентрации 50 мкг/мл). В качестве положительного контроля полной блокировки (100% ингибирование) можно добавлять образец, предварительно инкубированный с 50 мкг/мл немеченого контрольного антитела, а в качестве отрицательного контроля (отсутствие конкуренции; 0% ингибирование) при первичной инкубации можно использовать образец без антитела. Через 30 минут инкубации добавляют меченое, например, биотинилированное, контрольное антитело в концентрации 2 мкг/мл на лунку без отмывки. Образцы инкубируют в течение дополнительных 30 минут на льду. Несвязанные антитела удаляют посредством отмывки клеток буфером FACS. Связанное с клеткой меченое контрольное антитело детектируют с использованием средства, которым детектируют метку, например, конъюгированного с PE стрептавидина (Invitrogen, каталожный № S21388) для детекции биотина. Образцы помещают в проточный цитометр FACS Calibur (BD, San Jose) и анализируют с использованием программного обеспечения Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Результаты можно представлять в виде % ингибирования.

Как правило, затем тот же эксперимент проводят наоборот, например, тестируемое антитело представляет собой контрольное антитело, а контрольное

антитело представляет собой тестируемое антитело. В определенных вариантах осуществления антитело по меньшей мере частично (например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%) или полностью (100%) блокирует связывание другого антитела с мишенью, например, CD40 человека или его фрагментом, и вне зависимости от того, что ингибирование происходит когда контрольным антителом является одно или другое антитело. Контрольное антитело и тестируемое антитело "перекрестно блокируют" связывание друг друга с мишенью, когда антитела конкурируют друг с другом в обоих направлениях, например, в экспериментах по конкурированию, в которых первым добавляют контрольное антитело, и в экспериментах по конкурированию, в которых первым добавляют тестируемое антитело.

Антитела к huCD40 считают конкурирующими с антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе, если они ингибируют связывание 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 и/или 19G3 с CD40 человека по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, когда присутствуют приблизительно в равных концентрациях, например, в экспериментах по конкурированию, подобных тем, которые описаны в примере 4. Если не указано иначе, антитело считают конкурирующим с антителом, выбранным из группы, состоящей из антител к CD40 по настоящему изобретению, если оно уменьшает связывание выбранного антитела с CD40 человека (SEQ ID NO:1) по меньшей мере на 20%, когда его используют в приблизительно равной молярной концентрации с выбранным антителом, как определяют в экспериментах по конкурентному ELISA, как описано в двух предыдущих абзацах.

Антитела к huCD40, которые связываются с тем же эпитопом

Антитела к huCD40, которые связываются с теми же или сходными эпитопами, что и антитела, описываемые в настоящем документе, можно индуцировать с использованием протоколов иммунизации, подобных протоколам, описываемым в настоящем документе (примеры 1 и 2). Получаемые антитела можно подвергать скринингу на высокоаффинное связывание с CD40 человека (пример 3). Затем выбранные антитела можно исследовать в анализе дрожжевого дисплея, в котором на поверхности дрожжевых клеток презентированы варианты последовательностей huCD40 (пример 6), или в экспериментах по водородно-дейтериевому обмену (пример 5), с определением точного эпитопа, связываемого антителом.

Определение эпитопов можно проводить любым известным в данной области способом. В различных вариантах осуществления антитела к huCD40 считают связывающимися с тем же эпитопом что и mAb к huCD40, описываемые в настоящем документе, если они вступают в контакт с один или несколькими из тех же остатков по меньшей мере в одной области huCD40; если они вступают в контакт с большинством из остатков по меньшей мере один в одной области huCD40; если они вступают в контакт с большинством из остатков в каждой области huCD40; если они вступают в контакт с большинством из контактов на всем протяжении huCD40; если они вступают в контакт во всех тех же областях CD40 человека; если они вступают в контакт со всеми остатками в любой из областей CD40 человека; или если они вступают в контакт со всеми теми же остатками во всех тех же областях. "Области" эпитопов представляют собой кластеры остатков в первичной последовательности.

Способы определения антител, которые связывают "тот же эпитоп на huCD40" с антителами, описываемыми в настоящем документе, включают рентгенографические анализы кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. В других способах определяют связывание антитела с фрагментами антигена или мутантными вариантами антигена, где потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антиген часто считают показателем компонента эпитопа. Также способы могут основываться на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов (в нативной трехмерной форме или в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея или из продукта протеазного расщепления белка-мишени. Затем пептиды рассматривают как руководства для определения эпитопа, соответствующего антителу, используемому для скрининга пептидной библиотеки. Для картирования эпитопов также разработаны вычислительные алгоритмы, посредством которых, как было показано, картируют конформационные прерывистые эпитопы.

Эпитоп или область, содержащую эпитоп, также можно идентифицировать посредством скрининга связывания с рядом перекрывающихся пептидов, охватывающих CD40. Альтернативно, для направления отбора антител с тем же эпитопом и, таким образом, сходными с антителами к CD40, описываем в настоящем документе, свойствами можно использовать способ Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899. Сначала с использованием фагового дисплея тяжелую цепь антитела к CD40 спаривают с репертуаром легких цепей (предпочтительно человека) с выбором

связывающего CD40 антитела, а затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром тяжелых цепей (предпочтительно человека) с выбором связывающего CD40 антитела (предпочтительно человека) с тем же самым эпитопом или областью эпитопа, что и антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе. Альтернативно варианты антитела, описываемого в настоящем документе, можно получать посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела.

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

Эпитоп или область эпитопа ("область эпитопа" представляет собой область, содержащую эпитоп или перекрывающуюся с эпитопом), связываемую специфическим антителом, также можно определять, анализируя связывание антитела с пептидами, содержащими фрагменты CD40. Ряд перекрывающихся пептидов охватывающих последовательность CD40 (например, CD40 человека) можно синтезировать и подвергать скринингу на связывание, например, в прямом ELISA, конкурентном ELISA (когда пептид анализируют на его способность предотвращать связывание антитела с CD40, связанным с лункой планшета для микротитрования) или на чипе. Такие способы скрининга пептидов не могут детектировать определенные прерывистые функциональные эпитопы, например, функциональные эпитопы, содержащие аминокислотные остатки, которые не являются последовательными в первичной последовательности полипептидной цепи CD40.

Эпитоп также можно идентифицировать посредством основанного MS белкового футпринтинга, такого как масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) и быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP). HDX-MS можно проводить, например, как дополнительно описано в Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, способы из которой конкретно включены в настоящий документ в качестве ссылки. Пример 5. FPOP можно проводить, как описано, например, в Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, способы из которой конкретно включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Эпитоп, связываемый антителами к CD40, также можно определять структурными способами, такими как рентгенографическое определение кристаллической структуры (например, WO 2005/044853), молекулярное

моделирование и спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая определение ЯМР скоростей Н-D обмена лабильных атомов водорода амидов CD₄O, когда он находится в свободной форме и когда он связан в комплексе с представляющим интерес антителом (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884).

В отношении рентгеноструктурной кристаллографии, кристаллизацию можно проводить любым из известных в данной области способов (например, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1), включая микрообъем (например, Chayen (1997) *Structure* 5:1269), диффузию паров висючей капли (например, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300), затравку и диализ. Желательно использовать препарат белка с концентрацией по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл, а предпочтительно приблизительно от 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизацию лучше всего проводить в осаждающем растворе, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (PEG; средняя молекулярная масса в диапазоне приблизительно от 1000 до приблизительно 20000 Да), предпочтительно приблизительно от 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да, с концентрациями в диапазоне приблизительно от 10% до приблизительно 30% (масс./об.). Также может являться желательным включать стабилизатор белков, например, глицерин, в концентрации в диапазоне приблизительно от 0,5% до приблизительно 20%. Также в осаждающем растворе желательной может являться подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, предпочтительно в концентрации в диапазоне приблизительно от 1 мМ до приблизительно 1000 мМ. Осадитель предпочтительно буферируют при рН приблизительно от 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, пригодные в растворе осадителя могут варьировать и хорошо известны в данной области (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры пригодных буферов в качестве неограничивающих примеров включают HEPES, Tris, MES и ацетат. Кристаллы можно выращивать в широком диапазоне температур, включая 2°C, 4°C, 8°C и 26°C.

Кристаллы антитело:антиген можно изучать хорошо известными способами рентгенодифракции и можно детализировать с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемого Molecular Simulations, Inc.; см. например, Blundell & Johnson (1985)

Meth. Enzymol. 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикацию патентной заявки США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323), описания которых, таким образом, полностью включены в качестве ссылки.

Если не указано иначе и в контексте формулы изобретения, эпитоп, связываемый антителом, представляет собой эпитоп, как определено способами HDX-MS, по существу как описано в примере 5.

Антитела к CD40 с высокоаффинным связыванием

В определенных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению связываются с huCD40 с высокой аффинностью, подобно антителам к huCD40, описываемым в настоящем документе, что увеличивает вероятность того, что они являются эффективными терапевтическими средствами. В различных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению связываются с huCD40 с K_D менее 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 300 пМ или 100 пМ. В других вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению связываются с huCD40 с K_D от 2 нМ до 100 пМ. Стандартные анализы для оценки способности связывания антител с huCD40 включают ELISA, RIA, вестерн-блоттинг, интерферометрию биослоев (BLI) (см. пример 3) и анализ SPR BIACORE® (см. пример 4).

Варианты последовательностей антител к CD40

Можно допускать определенную вариабельность последовательностей антител, описываемых в настоящем документе, и все еще сохранять требуемые свойства антител. Области CDR устанавливают с использованием системы Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242). Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к антителам к huCD40, содержащим последовательности CDR, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательностям CDR антител, описываемых в настоящем документе (например, 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 и 19G3 и их гуманизированным производным). Настоящее изобретение также относится к антителам к huCD40, содержащим последовательности вариабельных доменов тяжелых и/или легких цепей, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательностям вариабельных доменов тяжелых

и/или легких цепей антител, описываемых в настоящем документе (например, 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 и 19G3 и их гуманизированных производных).

Антитела к CD40 с общими последовательностями CDR или происходящие из одних и тех же зародышевых линий мышей

Учитывая, что специфичность связывания антигенов преимущественно определяют CDR, антитела с общими последовательностями CDR с антителами, описываемыми в настоящем документе (например, 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 и 19G3) с большой вероятностью обладают их требуемыми свойствами. В определенных вариантах осуществления антитела к huCD40 по настоящему изобретению содержат переменные области тяжелых и легких цепей, происходящие из одних и тех же последовательностей V-областей и J-областей зародышевых линий мыши, что и антитела 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 или 19G3. Антитело 12D6 содержит тяжелую цепь, происходящую из зародышевых линий мыши VH1-39_01 и IGHJ4, и легкую цепь из зародышевых линий VK1-110_01 и IGKJ1. Антитело 5F11 содержит тяжелую цепь, происходящую из зародышевых линий мыши VH1-4_02 и IGHJ3, и легкую цепь из зародышевых линий VK3-5_01 и IGKJ5. Антитело 8E8 содержит тяжелую цепь, происходящую из зародышевых линий мыши VH1-80_01 и IGHJ2, и легкую цепь из зародышевых линий VK1-110_01 и IGKJ2. Антитело 5G7 содержит тяжелую цепь, происходящую из зародышевых линий мыши VH1-18_01 и IGHJ4, и легкую цепь из зародышевых линий VK10-96_01 и IGKJ2. Антитело 19G3 содержит тяжелую цепь, происходящую из зародышевых линий мыши VH5-9-4_01 и IGHJ3, и легкую цепь из зародышевых линий VK1-117_01 и IGKJ2. Последовательности областей D тяжелых цепей зародышевых линий (составляющие часть CDRH3) не указаны, так как их принадлежность часто трудно установить ввиду их высокой вариабельности, и, таким образом, антитела по настоящему изобретению могут содержать тяжелые цепи, происходящие из перечисленных зародышевых линий V- и J-областей и любой зародышевой линии D-области. Другие антитела, которые связываются с CD40 человека и происходят из некоторых или всех этих последовательностей зародышевых линий с большой вероятностью являются близкими по последовательности, особенно происходящие из тех же генов V-областей, и, таким образом, можно ожидать, что они также обладают теми же требуемыми свойствами.

Как используют в настоящем документе, антитело мыши содержит переменные области тяжелых или легких цепей, которые "происходят из" конкретной последовательности зародышевой линии, если переменные области антитела

получают из системы, в которой используют гены иммуноглобулинов зародышевой линии мыши, и последовательность антитела в достаточной степени близка к этой зародышевой линии так, что она с большей вероятностью происходит из данной зародышевой линии, чем из любой другой. Такие системы включают иммунизацию мыши представляющим интерес антигеном. Последовательность(и) иммуноглобулина зародышевой линии мыши, из которой "происходит" последовательность антитела можно идентифицировать, сравнивая аминокислотную последовательность антитела с аминокислотной последовательностью of иммуноглобулинов зародышевых линий мыши и выбирая последовательность иммуноглобулина зародышевой линии, которая является ближайшей по последовательности (например, с наибольшим % идентичности) с последовательностью антитела. Антитело мыши, которое "происходит из" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии может содержать отличающиеся аминокислоты по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, вследствие природных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-специфической мутации. Однако, как правило, выбранное антитело мыши по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-области). В определенных случаях антитело мыши может по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% являться идентичным по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-области). Как правило, антитело, происходящее из конкретной последовательности зародышевой линии мыши, содержит не более 10 отличающихся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-области), аминокислот. В определенных случаях, антитело мыши может содержать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 отличающихся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-области), аминокислот.

II. Сконструированные и модифицированные антитела

Области V_H и V_L

Также предоставлены сконструированные и модифицированные антитела, которые можно получать с использованием в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, где это модифицированное антитело может обладать измененными по сравнению с исходным антителом свойствами,

антитела с одной или несколькими из последовательностей V_H и/или V_L , описываемых в настоящем документе. Антитело можно конструировать посредством модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (например, V_H и/или V_L), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в одной или нескольких каркасных областях. Дополнительно или альтернативно антитело можно конструировать посредством модификации остатков в константной области(ях), например, с изменением эффекторной функции(й) антитела.

Одним из видов конструирования переменных областей, который можно проводить, является прививка CDR. Такую прививку конкретно применяют в гуманизированных не принадлежащих человеку антителах к CD40, которые конкурируют за связывание с антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе, и/или связываются с тем же эпитопом, что и антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелых и легких цепей. По этой причине, аминокислотные последовательности в CDR больше отличаются у различных антител, чем последовательности вне CDR. Так как последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые воспроизводят свойства конкретных контрольных антител, конструируя экспрессирующие векторы, которые содержат последовательности CDR из конкретного контрольного антитела, привитые на каркасные последовательности другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; патент США № 5225539, выданный Winter и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.)

Такие каркасные последовательности можно получать из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые содержат последовательности генов антител зародышевых линий. Например, последовательности ДНК зародышевых линий генов переменных областей тяжелых и легких цепей человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase", а также в Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline

V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; содержание каждой из которых явно включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Предпочтительные каркасные последовательности для использования в антителах, описываемых в настоящем документе, представляют собой каркасные последовательности, которые структурно сходны с каркасными последовательностями, используемыми в антителах, описываемых в настоящем документе. Последовательности CDR1, -2 и -3 V_H и последовательности CDR1, -2 и -3 V_L можно прививать на каркасные области с последовательностями, идентичными последовательностям, выявленным в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого получены каркасные последовательности, или последовательности CDR можно прививать на каркасные области, которые содержат до 20, предпочтительно консервативных, замен аминокислот по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, выявлено, что в определенных случаях для поддержания или усиления способности антитела связывать антиген целесообразным является проведение мутаций остатков в каркасных областях (см. например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al).

Сконструированные антитела, описываемые в настоящем документе, включают антитела, в которых модификации проводили в каркасных остатках V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антител. Часто такие модификации каркаса проводят для снижения иммуногенности антитела. Например, одним из подходов является "обратная мутация" одного или нескольких каркасных остатков к соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое претерпело соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой это антитело происходит. Такие остатки можно идентифицировать, сравнивая каркасные последовательности антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных областей к их конфигурации в зародышевой линии, соматические мутации можно подвергать "обратной мутации" к последовательности зародышевой линии, например, посредством сайт-специфического мутагенеза или опосредованного ПЦР мутагенеза. Такие антитела с "обратными мутациями" также предназначены для включения.

Другой вид модификации каркаса включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR с удалением Т-клеточных эпитопов, таким образом, снижая потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход, также обозначают как "деиммунизация", и он более подробно описан в патентной публикации США № 2003/0153043, зарегистрированной на Carr et al.

Другой вид модификации варибельной области представляет собой мутацию аминокислотных остатков в областях CDR с улучшением одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Для внесения мутации(й) и воздействия на связывание антитела или другое представляющее интерес функциональное свойство можно проводить сайт-специфический мутагенез или опосредованный ПЦР мутагенез. Предпочтительно вносят консервативные модификации. Мутации могут представлять собой добавления, делеции или, предпочтительно, замены аминокислот. Кроме того, как правило, в области CDR изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

Остатки метионина в CDR антител могут окисляться, приводя к потенциальной химической деградации и последовательному снижению активности антител. Таким образом, также предоставлены антитела к CD40, у которых один или несколько остатков метионина в CDR тяжелых и/или легких цепей заменены аминокислотными остатками, которые не претерпевают окислительной деградации. Подобным образом, из антител к CD40 можно удалять участки дезамидирования, в частности, в CDR. В антигенсвязывающем домене предпочтительно удаляют потенциальные участки гликозилирования для предотвращения гликозилирования, которое может препятствовать связыванию с антигеном. См., например, патент США № 5714350.

Связывание с антигенами-мишенями

В различных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению модифицируют для селективного блокирования связывания антигена в тканях и окружающих средах, где связывание антигена являться вредоносным, но обеспечения связывания антигена, где это может являться выгодным. В одном из вариантов осуществления получают блокирующую пептидную "маску", которая специфически связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связыванию антигена, где эта маска связана с каждым из связывающихся плеч антитела посредством расщепляемого пептидазой линкера. См., например, патент США № 8518404, выданный CytomX. Такие конструкции пригодны для лечения

злокачественных опухолей, в которых в опухолевом микроокружении по сравнению с неопухолевыми тканями значительно повышены уровни протеаз. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли обеспечивает диссоциацию маскирующего/блокирующего пептида, обеспечивая селективное связывание антигена в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызывать нежелательные побочные эффекты.

Альтернативно, в родственном варианте осуществления разрабатывают бивалентное связывающее соединение ("маскирующий лиганд"), содержащее два антигенсвязывающих домена, которое связывается с двумя антигенсвязывающими поверхностями (бивалентного) антитела и препятствуют связыванию антигена, где две связывающих домена-маски связаны друг с другом (но не с антителом) расщепляемым линкером, например, расщепляемым пептидазой. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 2010/077643, зарегистрированной на Tegopharm Corp. Маскирующие лиганды могут содержать антиген, с которым предназначено связываться антитело или могут происходить из него или их можно получать независимо. Такие маскирующие лиганды пригодны для лечения злокачественных опухолей, в которых в микроокружении опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями значительно повышены уровни протеаз. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли обеспечивает диссоциацию двух связывающих доменов друг от друга, снижая avidность для антигенсвязывающих поверхностей антитела. Происходящая в результате диссоциация маскирующего лиганда и антитела обеспечивает селективное связывание антигена в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызывать нежелательные побочные эффекты

Fc и модифицированные Fc

Антитела по настоящему изобретению могут содержать вариабельные домены по изобретению, комбинированные с константными доменами, содержащими различные Fc-области, выбранные на основе видов биологической активности (в случае необходимости) антитела для предусмотренного применения. Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369. Например, IgG человека можно классифицировать на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из них содержит Fc-область с уникальным профилем связывания с одним или несколькими из рецепторов Fcγ (активирующими рецепторами FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32a,c); FcγRIIA и FcγRIIB (CD16a,b) и ингибирующим рецептором FcγRIIB (CD32b) и с первым

компонентом комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми рецепторами Fc γ ; связывается с IgG2 Fc γ RIIA_{H131} и с меньшей аффинностью с Fc γ RIIA_{R131}, Fc γ RIIA_{V158}; IgG4 связывается с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC и Fc γ RIIA_{V158}; а ингибирующий рецептор Fc γ RIIB обладает сниженной аффинностью к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие рецепторы Fc γ . Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716. Исследования показали, что Fc γ RI не связывается с IgG2, а Fc γ RIIB не связывается с IgG2 или IgG4. Там же. Как правило, в отношении активности ADCC, IgG1 человека $\geq$ IgG3 $\gg$ IgG4 $\geq$ IgG2. В результате, например, для применения в лекарственном средстве, где необходима ADCC можно выбирать константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4; IgG3 можно выбирать, если требуется активация экспрессирующих Fc γ RIIA НК клеток, моноцитов или макрофагов; и IgG4 можно выбирать, если антитело необходимо использовать для десенсибилизации пациентов с аллергией. IgG4 также можно выбирать, если необходимо, чтобы у антитела отсутствовали все эффекторные функции.

Вариабельные области антител к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно связывать (например, ковалентно связывать или сливать) с Fc, например, с Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые могут быть любого аллотипа или изоаллотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v);. См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). На выбор аллотипа могут влиять вопросы, связанные с возможной с иммуногенностью, например, с минимизацией формирования антител к лекарственному средству.

В предпочтительных вариантах осуществления антитела к CD40 по настоящему изобретению содержат Fc, которая связывается или усиленно связывается с Fc γ RIIb, который может обеспечивать усиленное агонистическое действие. См., например, WO 2012/087928; Li & Ravetch (2011) Science 333:1030; Wilson et al. (2011) Cancer Cell 19:101; White et al. (2011) J. Immunol. 187:1754. Вариабельные области, описываемые в настоящем документе, можно связывать с вариантами Fc, которые увеличивают аффинность к ингибирующему рецептору Fc γ RIIb, например, для усиления активности, индуцирующей апоптоз или адьюванта. Li & Ravetch (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109:10966; публикация патентной заявки США 2014/0010812. Такие варианты могут обеспечивать получение антитела с иммуномодулирующей активностью, связанной с Fc γ RIIb⁺ клетками, например, включающими В-клетки и моноциты. В одном из

вариантов осуществления варианты Fc обеспечивают селективно увеличенную аффинность к FcγRIIb относительно одного или нескольких активирующих рецепторов. Такие варианты также могут проявлять увеличенное перекрестное связывание, опосредуемое FcR, что приводит к увеличенной терапевтической эффективности. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают одну или несколько модификаций в положениях, выбранных из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332 в соответствии с индексом EU. Иллюстративные замены для усиления аффинности к FcγRIIb в качестве неограничивающих примеров включают 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Иллюстративные замены включают 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E и 267E-328F. В частности, особое значение для специфически усиленной аффинности к ингибирующему рецептору FcγRIIb имеют варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включая двойной вариант S267E-L328F IgG1 человека. Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926; публикация патентной заявки США 2006/024298; WO 2012/087928. Увеличенной специфичности к FcγRIIb (в отличие от FcγRIIa_{R131}) можно добиться, проводя замену P238D и другие мутации (Mimoto et al. (2013) Protein. Eng. Des. & Selection 26:589; WO 2012/1152410), а также V262E и V264E (Yu et al. (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:9723 и WO 2014/184545. См. таблицу 4.

Продление времени полужизни

В определенных вариантах осуществления антитело модифицируют для увеличения его времени биологической полужизни. Возможны различные подходы. Например, это можно проводить, увеличивая аффинность связывания Fc-область к FcRn. В одном из вариантов осуществления антитело изменяют в области C_H1 или C_L так, чтобы она содержала эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена C_H2 Fc-область IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022, выданных Presta et al. Другие иллюстративные варианты Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308 и 434, включая например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые увеличивают связывание Fc с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. (2006) Journal of Immunology

176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al. (2001) *Journal of Biological Chemistry* 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. (2002) *Journal of Immunology* 169:5171-5180, Dall'Acqua et al. (2006) *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). См. патент США № 8367805.

В качестве способа увеличения аффинности к FcRn, таким образом, увеличивая время полужизни антитела в циркуляции, предложена модификация определенных консервативных остатков Fc IgG (I253, H310, Q311, H433, N434), такая как вариант N434A (Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663). См. WO 98/023289. Показано, что комбинационный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, увеличивает связывание с FcRn и увеличивает время полужизни в сыворотке в пять раз. Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Комбинационный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A также увеличивает время полужизни антител IgG1. Petkova et al. (2006) *Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, также показано, что время полужизни продлевают комбинационные варианты Fc, включающие варианты M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M и M428L-N434S. См. WO 2009/086320.

Кроме того, комбинационный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает время полужизни приблизительно в 4 раза. Dall'Acqua et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Связанную модификацию IgG1, обеспечивающую увеличенную аффинность к FcRn, но сниженную зависимость от pH (M252Y-S254T-T256E-H433K-N434F) использовали для получения конструкции IgG1 ("MST-HN Abdeg") для применения в качестве конкурирующего средства для предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводило к снижению выведению этих других антител, эндогенных IgG (например, в условиях аутоиммунитета) или других экзогенных (терапевтических) mAb. Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834.

Другие модификации для увеличения связывания с FcRn описаны в Yeung et al. (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6277375; 6821505; WO 97/34631 и WO 2002/060919.

В определенных вариантах осуществления для увеличения связывания с FcRn и, потенциально, увеличения времени полужизни можно использовать гибридные изотипы IgG. Например, можно конструировать гибридный вариант IgG1/IgG3 посредством замены в положениях IgG1 областей C_H2 и/или C_H3 аминокислотами из IgG3 в положениях, где эти два изотипа различаются. Таким образом, можно конструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или

несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В других вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, можно конструировать гибридный вариант IgG1/IgG2 посредством замены в положениях IgG2 областей C_H2 и/или C_H3 аминокислотами из IgG1 в положениях, где эти два изотипа различаются. Таким образом, можно конструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например, одну или несколько из следующих замен аминокислот: 233E, 234L, 235L, -236G (относительно вставки глицина в положении 236) и 327A. См. патент США № 8629113. Получены гибриды последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, которые предположительно увеличивают время полужизни в сыворотке и улучшают экспрессию. Патент США № 7867491 (последовательность номер 18 в нем).

Время полужизни антител по настоящему изобретению в сыворотке также можно увеличивать посредством пегилирования. Антитело можно пегилировать, например, для увеличения биологической (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для пегилирования антитела, антитело или его фрагмент, как правило, подвергают реакции с реагентом полиэтиленгликоля (PEG), таким как реакционноспособные сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, в которых с антителом или фрагментом антитела связываются одна или несколько групп PEG. Предпочтительно, пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой PEG (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Как используют в настоящем документе, термин "полиэтиленгликоль" предназначен для включения любой из форм PEG, которые используют для дериватизации других белков, таких как моно-(C₁-C₁₀)-алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. В определенных вариантах осуществления антитело для пегилирования представляет собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования белков известны в данной области, и их можно применять для антител, описываемых в настоящем документе. См. например, EP 0154316, выданном Nishimura et al., и EP 0401384, выданном Ishikawa et al.

Альтернативно, в определенных обстоятельствах, желательным может являться уменьшить время полужизни антитела по настоящему изобретению, а не увеличить его. Модификации Fc IgG1 человека, такие как I253A (Hornick et al. (2000) J. Nucl. Med. 41:355) и H435A/R, I253A или H310A (Kim et al. (2000) Eur. J. Immunol. 29:2819), могут уменьшать связывание с FcRn, таким образом уменьшая время полужизни (увеличивая

выведение) для применения в ситуациях, когда предпочтительным является быстрое выведение, например, при медицинской визуализации. Kenanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие средства увеличения выведения включают форматирование антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению в виде фрагментов антител с отсутствием способности связываться с FcRn, таких как фрагменты Fab. Такая модификация может уменьшать время полужизни антитела в циркуляции с двух недель до нескольких часов. Если необходимо, для тонкой настройки (увеличения) времени полужизни фрагментов антител затем можно использовать селективное пегилирование фрагментов антител. Chapman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антител также можно сливать с сывороточным альбумином человека, например, в конструкции слитого белка, с увеличением времени полужизни. Yeh et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:1904. Альтернативно, можно конструировать биспецифическое антитело с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с сывороточным альбумином человека (HSA). См. публикацию международной патентной заявки WO 2009/127691 и цитируемые в ней ссылки на патенты. Альтернативно, к фрагментам антител для увеличения времени полужизни можно добавлять специализированные полипептидные последовательности, например, полипептидные последовательности "XTEN". Schellenberger et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; публикация международной патентной заявки WO 2010/091122.

Дополнительные варианты Fc

Как правило, при использовании константного домена IgG4 предпочтительно включать замену S228P, которая воспроизводит последовательность шарнира IgG1 и, таким образом, стабилизирует молекулы IgG4, например, снижая обмен плечами Fab между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у подвергнутого лечению пациента. Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925.

Потенциальные участки расщепления протеазами в шарнирах конструкций IgG1 можно устранять посредством модификаций D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела. WO 2014/043344.

Аффинности и свойства связывания вариантов Fc в отношении их лигандов (рецепторов Fc) можно определять рядом способов анализа *in vitro* (биохимические или иммунологические анализы), известных в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров, равновесные способы (например, твердофазный

иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммунологический анализ (RIA)) или кинетические способы (например, анализ SPR BIACORE®) и другие способы, такие как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), электрофорез в геле и хроматография (например, гель-фильтрация). В этих и других способах в одном или нескольких анализируемых компонентах можно использовать метку и/или использовать ряд способов детекции, включая в качестве неограничивающих примеров хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей и кинетики связывания можно найти в Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в котором уделено большое внимание взаимодействиям антитело-иммуноген.

В других вариантах осуществления гликозилирование антитела модифицируют для усиления или ослабления эффекторной функции. Например, можно получать агликозилированное антитело с отсутствием всех эффекторных функций посредством мутации консервативного остатка аспарагина в положении 297 (например, N297A), таким образом, устраняя связывание комплемента и FcγRI. Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (с использованием N297Q в IgG1 с устранением гликозилирования в положении 297).

Хотя у агликозилированных антител, как правило, отсутствует эффекторная функция, можно вносить мутации для восстановления этой функции. Агликозилированные антитела, например, агликозилированные антитела являющиеся результатом мутаций N297A/C/D/или H или полученные в системах (например, *E. coli*), в которых не происходит гликозилирования белков, можно дополнительно подвергать мутациям с восстановлением связывания FcγR, например, S298G и/или T299A/G/или H (WO 2009/079242) или E382V и M428I (Jung et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:604).

Также можно использовать гликоинженерию для модификации противовоспалительных свойств конструкции IgG, заменяя содержание α2,6-сиаловых кислот углеводных цепей, связанных с Asn297 Fc-области, где увеличенная доля α2,6-сиалированных форм приводит к усилению противовоспалительного действия. См. Nimmerjahn et al. (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. И наоборот, уменьшение доли антител с α2,6-сиалированными углеводами может являться пригодным в случаях, когда противовоспалительные свойства являются нежелательными. Способы модификация содержания α2,6-сиаловых кислот антител, например, посредством

селективного удаления $\alpha 2,6$ -сиалированных форм или посредством ферментативной модификации, предоставлены в публикации патентной заявки США № 2008/0206246. В других вариантах осуществления аминокислотную последовательность Fc-области можно модифицировать для воспроизводства действия $\alpha 2,6$ -сиалирования, например, включая модификацию F241A. WO 2013/095966.

III. Физические свойства антител

Антитела, описываемые в настоящем документе, в любой из вариабельных областей легких или тяжелых цепей могут содержать один или несколько участков гликозилирования. Такие участки гликозилирования могут приводить к увеличенной иммуногенности антитела или к изменению рК антитела вследствие измененного связывания антигена (Marshall et al. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J. Immunol. 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J. Exp. Med. 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит по мотивам, содержащим последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях предпочтительно получать антитело к huCD40, которое не содержит гликозилированной вариабельной области. Этого можно достигать посредством выбора антител, не содержащих мотива гликозилирования в вариабельной области, или посредством мутации остатков в области гликозилирования.

В определенных вариантах осуществления антитела, описываемые в настоящем документе, не содержат участков изомерии аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить по последовательностям N-G или D-G и приводить к получению остатка изоаспарагиновой кислоты, который вносит изгиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (действие изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело обладает уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая, как правило, находится в диапазоне pH от 6 до 9,5. Как правило, pI антитела IgG1 находится в диапазоне pH 7-9,5, а pI антитела IgG4, как правило, находится в диапазоне pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI вне нормального диапазона могут обладать нарушенной укладкой и нестабильностью в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительно получать антитело к CD40, со значением pI, которое попадает в нормальный диапазон. Этого можно достигать выбором антитела с pI в нормальном диапазоне или подвергая мутации заряженные остатки на поверхности.

Каждое антитело обладает характеристической температурой плавления, где более высокая температура плавления означает большую общую стабильность *in vivo*

(Krishnamurthy & Manning (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_m (температура начального разворачивания) составляла более 60°C, предпочтительно более 65°C, даже более предпочтительно более 70°C. Температуру плавления антитела можно определять с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol Lett.* 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9). В предпочтительном варианте осуществления выбраны антитела, которые не подвержены быстрой деградации. Деградацию антител можно определять с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander & Hughes (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32).

В другом предпочтительном варианте осуществления выбраны антитела с минимальными эффектами агрегации, которые могут приводить к инициации нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, приемлемыми являются антитела с агрегацией 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, даже более предпочтительно 15% или менее, даже более предпочтительно 10% или менее и даже более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно определять несколькими способами, включая эксклюзионную хроматографию (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и светорассеяние.

IV. Молекулы нуклеиновых кислот

Другой аспект, описываемый в настоящем документе, относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, описываемые в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты могут находиться в цельных клетках, в клеточном лизате или в частично выделенной или по существу в чистой форме. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "является по существу чистой", когда ее стандартными способами, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие хорошо известные в данной области способы, очищают от других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков. См., F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота, описываемая в настоящем документе, может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не

содержать интронные последовательности. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, описываемые в настоящем документе, можно получать стандартными способами молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых посредством гибридом (например, гибридом, получаемых из трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулинов человека, как описано далее), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антител, получаемых посредством гибридом, можно получать посредством стандартных способов амплификации ПЦР или клонирования кДНК. Для антител, получаемых из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием способов фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделять из библиотеки.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих участки V_H и V_L , эти фрагменты ДНК можно дополнительно модифицировать посредством стандартных технологий рекомбинантных ДНК, например, с преобразованием генов переменных областей в гены полноразмерных цепей антител, в гены фрагментов Fab или в ген scFv. При этих модификациях кодирующие V_L или V_H фрагменты ДНК функционально связаны с другими фрагментами ДНК, кодирующими другие белки, такие как константная область антитела или гибкий линкер. Как используют в этом контексте, термин "функционально связанный" предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК связаны так, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, находятся в одной рамке считывания.

Выделенные ДНК, кодирующие область V_H , можно преобразовывать в ген полноразмерной тяжелой цепи посредством функционального связывания кодирующей V_H ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, C_H1 , C_H2 и/или C_H3). Последовательности генов константных областей тяжелых цепей человека известны в данной области (см. например, Kabat, E. A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, содержащие эти области, можно получать стандартной амплификацией ПЦР. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, область IgG1. Для гена тяжелой цепи фрагмента Fab, кодирующую V_H ДНК можно функционально связывать с другой молекулой ДНК, кодирующей только C_H1 константной области тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую область V_L можно преобразовывать в ген полноразмерной легкой цепи (также в ген легкой цепи Fab) посредством функционального связывания кодирующей V_L ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, C_L . Последовательности генов константных областей легких цепей человека известны в данной области (см. например, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и фрагменты ДНК, содержащие эти области, можно получать стандартной амплификацией ПЦР. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

Для получения гена scFv, кодирующие V_H и V_L фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибким линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4-Ser)_3$, так, что последовательности V_H и V_L можно экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями V_L и V_H , связанными гибким линкером (см. например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554).

V. Получение антител

Различные антитела по настоящему изобретению, например, антитела, которые конкурируют с антителами к CD40 человека, описываемыми в настоящем документе, или связываются с тем же эпитопом, что и они, можно получать рядом известных способов, таких как способ стандартной гибридизации соматических клеток, описанный Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975). Хотя способы гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе также можно использовать и другие способы получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию В лимфоцитов, способ фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека.

Предпочтительной животной системой для получения антител является мышьяная система. Получение гибридом у мышей представляет собой очень хорошо разработанный способ. В данной области известны протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния. Также известны партнеры для слияния (например, миеломные клетки мыши) и способы слияния.

Химерные или гуманизированные антитела, описываемые в настоящем документе, можно получать на основе последовательности моноклонального антитела

мышь, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов можно получать из представляющей интерес гибридомы мыши и стандартными способами молекулярной биологии конструировать так, чтобы она содержала не принадлежащие мышь (например, принадлежащие человеку) последовательности иммуноглобулинов. Например, для получения химерного антитела переменные области мыши можно известными в данной области способами связывать с константными областями человека (см. например, патент США № 4816567, выданный Cabilly et al.). Для получения гуманизированного антитела, области CDR мыши можно известными в данной области способами встраивать в каркас человека (см. например, патент США № 5225539, выданный Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

В одном из вариантов осуществления антитела, описываемые в настоящем документе, представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные к CD40 человека, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, обозначаемых в настоящем документе как мыши HuMAb и мыши КМ, соответственно, и коллективно обозначаемых в настоящем документе как "мышь с Ig человека".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.), совместно с направленными мутациями, которые инактивируют локусы эндогенных цепей μ и κ , несет минилокусы генов иммуноглобулинов человека, которые кодируют неперегруппированные последовательности тяжелых (μ и γ) и легкой κ цепей иммуноглобулинов (см. например, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474):856-859). Таким образом, у мышей наблюдают сниженную экспрессию IgM или κ мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелых и легких цепей человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с получением высокоаффинных моноклональных IgGк человека (Lonberg, N. et al. (1994), выше; рассмотрено в Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и использование мышей HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мыши, дополнительно описаны в Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature*

Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; и Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, содержание которых, таким образом, конкретно полностью включено в качестве ссылки. Дополнительно см. патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429, все выданные Lonberg и Kay; патент США № 5545807, выданный Surani et al.; публикации PCT №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все Lonberg и Kay; и публикацию PCT № WO 01/14424 Korman et al.

В определенных вариантах осуществления антитела, описываемые в настоящем документе, индуцируют с использованием мышей, несущих последовательности иммуноглобулинов человека на трансгенах и трансхромосомах, таких как мыши, несущие трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, обозначаемые в настоящем документе как "мыши КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 Ishida et al.

Кроме того, в данной области доступны и можно использовать для индукции антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующих гены иммуноглобулинов человека. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, обозначаемую как Xenomouse® (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, выданных Kucherlapati et al.

Кроме того, в данной области доступны и можно использовать для индукции антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующих гены иммуноглобулинов человека. Например, можно использовать мышей, несущих трансхромосому тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека, обозначаемых как "мыши ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Кроме того, в данной области описаны и можно использовать для индукции антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, коровы, несущие трансхромосомы тяжелых и легких цепей человека (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894).

Дополнительные системы мышей, описанные в данной области для индукции антител человека, например, антител к huCD40 человека, включают (i) мышей VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которых эндогенные варибельные

области тяжелых и легких цепей мыши посредством гомологичной рекомбинации заменены переменными областями тяжелых и легких цепей человека, функционально связанными с эндогенными константными областями мыши так, что у мышей происходит индукция химерных антител (V человека/C мыши), а затем их конвертируют в полностью принадлежащие человеку антитела посредством стандартных технологий рекомбинантной ДНК; и (ii) мыши MEMO® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), где мышь несет неперегруппированные переменные области тяжелых цепей человека, но единственную перегруппированную общую переменную область легкой цепи человека. Такие мыши и их использование для индукции антител, описаны, например, в WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Моноклональные антитела человека, описываемые в настоящем документе, также можно получать способами фагового дисплея со скринингом библиотек генов иммуноглобулинов человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека общепризнаны в данной области. См. например: патенты США №№ 5223409; 5403484 и 5571698, выданные Ladner et al.; патенты США №№ 5427908 и 5580717, выданные Dower et al.; патенты США №№ 5969108 и 6172197, выданные McCafferty et al.; и патенты США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданные Griffiths et al.

Моноклональные антитела человека, описываемые в настоящем документе, также можно получать с использованием мышей SCID у которых восстановлены иммунциты человека так, что при иммунизации можно получать ответ антителами человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767, выданных Wilson et al.

Способы иммунизации

Для получения полностью принадлежащих человеку антител к CD40 мышей или трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих гены иммуноглобулинов человека (например, мышей HCo12, HCo7 или KM) можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена CD40 и/или клеток, экспрессирующих CD40, как описано для других антигенов, например, в Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 и WO 98/24884. Альтернативно, мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей CD40 человека. Предпочтительно, возраст мышей при первой инфузии составляет 6-16

недель. Например, для интраперитонеальной иммунизации мышей можно использовать очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена CD40 человека. В том случае, если иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена CD40 не приводит к индукции антител, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими CD40, например клеточной линией, для стимуляции иммунного ответа.

Накопленный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши NuMAb наилучшим образом реагируют, когда сначала их иммунизируют антигеном интраперитонеально (и/п) или подкожно (п/к) в адъюванте Рибидина с последующими и/в/п/к иммунизациями антигеном в адъюванте Рибидина раз в две недели (всего до 10). Иммунный ответ при проведении протокола иммунизации можно контролировать с использованием образцов плазмы, получаемых посредством ретроорбитальных заборов крови. Плазму можно подвергать скринингу посредством ELISA и FACS (как описано ниже), и для слияний можно использовать мышей с достаточными титрами иммуноглобулинов к CD40 человека. Мышей можно внутривенно стимулировать антигеном с последующим умерщвлением через 3 суток и удалением селезенки и лимфоузлов. Полагают, что для каждой иммунизации может потребоваться проведение 2-3 слияний. Как правило, для каждого антигена иммунизируют от 6 до 24 мышей. Как правило, используют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, трансгены HCo7 и HCo12 можно скрещивать друг с другом в одной мыши с двумя различными трансгенами тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к CD40

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, описываемые в настоящем документе, спленоциты и/или клетки лимфоузлов иммунизированных мышей можно выделять и сливать с подходящей линией immortalized клеток, такой как линия клеток миеломы мыши. Полученные гибридомы можно подвергать скринингу с получением специфичных к антигенам антител. Например, суспензии одиночных клеток лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей можно сливать с несекретирующими миеломными клетками мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) с использованием 50% PEG. Клетки высевают приблизительно при 2×10^5 в плоскодонный планшет для микротитрования с последующей инкубацией в течение двух недель в селективной среде, содержащей 10% сыворотку FetalClone, 18% кондиционированные среды "653", 5% Origen (IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50

единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и $1 \times$ НАТ (Sigma). Приблизительно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой НАТ заменена на НТ. Затем отдельные лунки можно подвергать скринингу посредством ELISA на моноклональные антитела IgM и IgG человека. После начала значительного роста гибридомы можно проводить наблюдение среды, как правило, через 10-14 суток. Секретирующие антитела гибридомы можно повторно высевать на планшеты, повторно подвергать скринингу и при положительной реакции на IgG человека, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды посредством лимитирующего разведения. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* с получением небольших количеств антитела в среде для культивирования тканей для характеристики.

VI. Производство антител

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к CD40

Антитела по настоящему изобретению, включая специфические антитела, для которых предоставлены последовательности, и другие, родственные антитела к CD40, можно получать в клетке-хозяине трансфектом с использованием, например, комбинации технологий рекомбинантных ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно в данной области (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или их фрагментов можно стандартными способами молекулярной биологии (например, амплификация ПЦР или клонирование кДНК с использованием гибридомы, экспрессирующей представляющее интерес антитело) получать ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, и эти ДНК можно встраивать в экспрессирующие векторы так, чтобы гены были функционально связаны с контролируемыми транскрипцию и трансляцию последовательностями. В этом контексте термин "функционально связанный" предназначен для обозначения того, что ген антитела лигирован в вектор так, что контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности в вектор служат их предусмотренной функции регуляции транскрипция и трансляция гена антитела. Экспрессирующий вектор и контролирующие экспрессию последовательности выбирают так, чтобы они были совместимым с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в отдельные векторы или оба гена встраивают в один экспрессирующий вектор. Гены антител встраивают в экспрессирующий вектор(ы) стандартными способами (например, лигирования комплементарных участков рестрикции на

фрагменте гена антитела и векторе, или лигирования тупых концов, если отсутствуют участки рестрикции). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, описываемых в настоящем документе, можно использовать для получения полноразмерных генов антител любого изотипа антител, встраивая их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелых цепей и легких цепей желаемого изотипа так, что сегмент V_H функционально связан в векторе с сегментом(ами) C_H , и сегмент V_L функционально связан в векторе с сегментом C_L . Дополнительно или альтернативно рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор так, что сигнальный пептид связан в рамке считывания с N-концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (например, сигнальный пептид не являющегося иммуноглобулином белка).

В дополнение к генам цепей антитела рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Термин "регуляторная последовательность" предназначен для включения промоторов, энхансеров и других контролирующих экспрессию элементов (например, сигналов полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антител. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Экспрессия Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в данной области понятно, что конструкция экспрессирующего вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, уровня экспрессии требуемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые обуславливают высокие уровни экспрессии белков в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и полиомавирусов. Альтернативно можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убиквитина или промотор β -глобина. Кроме того, можно использовать регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из различных источников, такие промоторная система $SR\alpha$, которая содержит

последовательности раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса лейкоза Т-клеток человека типа 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

В дополнение к генам цепей антител и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, участки начала репликации), и гены селективных маркеров. Ген селективного маркера облегчает выделение клеток-хозяев, в которые введен (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все выданные Axel et al.). Например, как правило, ген селективного маркера придает клетке-хозяину, в которую введен этот вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Предпочтительные гены селективных маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в клетках-хозяевах dhfr- с селекцией/амплификацией с метотрексатом) и ген нео (для селекции с G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессирующий вектор(ы), кодирующий тяжелую и легкую цепи, стандартными способами трансфицируют в клетку-хозяина. Различные формы термина "трансфекция" предназначены для включения широкого спектра способов широко используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорации, осаждения фосфатом кальция, трансфекции с DEAE-декстраном и т.п. Хотя антитела, описываемые в настоящем документе, теоретически возможно экспрессировать в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках, и наиболее предпочтительно - в клетках-хозяевах млекопитающих, является наиболее предпочтительной, так как такие эукариотические клетки, и особенно клетки млекопитающих, с большей вероятностью, чем прокариотические клетки транслируют и секретируют правильно уложенное и иммунологически активное антитело. Опубликовано, что прокариотическая экспрессия генов антител неэффективна для получения больших выходов активных антител (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13). Антитела по настоящему изобретению также можно получать в гликоинженерных штаммах дрожжей *Pichia pastoris*. Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител, описываемых в настоящем документе, включают клетки китайского хомяка (клетки CHO) (включая клетки CHO dhfr-, описанные в Urlaub and

Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, используемые с селективным маркером DHFR, например, как описано в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), миеломные клетки NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для применения с миеломными клетками NSO, другая предпочтительная экспрессирующая система представляет собой систему экспрессии генов GS, описанную в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены антител, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают посредством культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения экспрессии антител в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секреции антител в среду для культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно выделять из среды для культивирования стандартными способами выделения белков.

N- и C-концы полипептидных цепей антител по настоящему изобретению могут отличаться от ожидаемой последовательности ввиду наблюдаемых в большинстве случаев посттрансляционных модификаций. Например, в тяжелых цепях антител часто отсутствуют C-концевые остатки лизина. Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. N-концевые остатки глутамина, и в меньшей степени остатки глутаминовой кислоты, на легких и тяжелых цепях терапевтических антител часто преобразуются в остатки пироглутаминовой кислоты. Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

Аминокислотные последовательности различных агонистических антител к huCD40 по настоящему изобретению предоставлены в списке последовательностей, который приведен в таблице 8. По указанным выше причинам C-концевой лизин не включен ни в одну из последовательностей списка последовательностей тяжелых цепей или константных доменов тяжелых цепей. Однако в альтернативном варианте осуществления каждая тяжелая цепь антител к huCD40 по настоящему изобретению и/или генетическая конструкция, кодирующая такие антитела или их тяжелые или легкие цепи, содержат этот дополнительный остаток лизина на C-конце одной или обеих тяжелых цепей.

VII. Анализы

Антитела, описываемые в настоящем документе, можно тестировать на связывание с CD40, например, посредством стандартного ELISA. В кратком изложении, планшеты для микротитрования покрывают очищенным CD40 при 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. В

каждую лунку добавляют разведения антитела (например, разведения плазмы иммунизированных CD40 мышей) и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Планшеты отмывают PBS/Tween, а затем инкубируют со вторичным реагентом (например, для антител человека или антител, в других случаях содержащих константную область тяжелой цепи человека, Fc-специфичный поликлональный реагент козы к IgG человека), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 часа при 37°C. После отмывки в планшетах проводят развитие окраски с субстратом ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют на спектрофотометре при OD 415-495. Затем сыворотки иммунизированных мышей подвергают дополнительному скринингу посредством проточной цитометрии на связывание с линией клеток, экспрессирующих CD40 человека, но не с контрольной линией клеток, которая не экспрессирует CD40. В кратком изложении, связывание антител с CD40 оценивают посредством инкубации экспрессирующих CD40 клеток CHO с антителом к CD40 при разведении 1:20. Клетки отмывают и связывание детектируют с использованием меченного PE Ab к IgG человека. Анализы проточной цитометрии проводят с использованием проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Предпочтительно, для слияний используют мышей, у которых развиваются наибольшие титры. Аналогичные эксперименты можно проводить с использованием детекционных антител к молекулам мыши, если детектируют антитела мыши к huCD40.

ELISA, как описано выше, можно использовать для скрининга антител и, таким образом, гибридом, которые продуцируют антитела, которые демонстрируют положительную реакцию с иммуногеном CD40. Затем гибридомы, продуцирующие антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с CD40, можно субклонировать и дополнительно охарактеризовать. Затем один из клонов каждой гибридома, который сохраняет реакционную способность исходных клеток (посредством ELISA), можно выбирать для получения банка клеток и для очистки антител.

Для очистки антител к CD40 выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых флаконах с перемешиванием для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать с последующей аффинной хроматографией на сефарозе с белком А (Pharmacia, Piscataway, NJ). Для доказательства чистоты элюированные IgG можно проверять посредством электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Раствор

буфера можно заменить на PBS, и концентрация можно определять при OD₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделять на аликвоты и хранить при -80°C.

Чтобы определить, связываются ли моноклональные антитела к CD40 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированных MAb можно детектировать меченным стрептавидином зондом. Можно проводить исследования конкуренции с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител с использованием покрытых CD40 планшетов для ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа выделенных антител, можно проводить изотипирующие ELISA с использованием реагентов, специфичных к антителам конкретного изотипа. Например, для определения изотипа моноклонального антитела человека лунки планшетов для микротитрования можно в течение ночи при 4°C покрывать 1 мкг/мл антител к иммуноглобулинам человека. После блокирования 1% BSA в планшетах проводят реакцию с 1 мкг/мл или менее тестируемых моноклональных антител или очищенных изотипических контролей при температуре окружающей среды в течение одного-двух часов. Затем у лунках можно проводить реакцию со специфичными к IgG1 человека или IgM человека конъюгированными с щелочной фосфатазой зондами. Затем в планшетах проводят развитие окраски и анализ, как описано выше.

Для тестирования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими CD40, можно использовать проточную цитометрию. В кратком изложении, линии клеток, экспрессирующих мембраносвязанный CD40 (выращиваемые в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA при 4°C в течение 1 часа. После отмывки проводят реакцию клеток с меченным фикоэритрином (PE) антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичным антителом. Образцы можно анализировать посредством устройства FACSscan с использованием света свойства свето- и бокового рассеяние с пропусканием одиночных клеток и определением связывания меченых антител. В дополнение или вместо анализа проточной цитометрии можно использовать альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше и анализировать посредством флуоресцентной микроскопии. Этот способ обеспечивает

визуализацию отдельных клеток, но может обладать меньшей чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Антитела к huCD40 можно дополнительно тестировать на реакционноспособность с антигеном CD40 посредством вестерн-блоттинга. В кратком изложении, можно получать клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих CD40 и подвергать электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% сывороткой мыши и зондируют тестируемыми моноклональными антителами. Связывание IgG можно детектировать с использованием антител к IgG с щелочной фосфатазой, и развитие окраски проводить с таблетками субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

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

В одном из вариантов осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью CD40 человека. Антитело может специфически связываться с конкретным доменом (например, функциональным доменом) внеклеточного домена CD40. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью CD40 человека и внеклеточной областью CD40 яванского макака. Предпочтительно антитело связывается с CD40 человека с высокой аффинностью.

VIII. Биспецифические молекулы

Антитела, описываемые в настоящем документе, можно использовать для получения биспецифических молекул. Антител к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора) с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело, описываемое в настоящем документе, фактически можно дериватизировать или связывать более чем с одной другой функциональной молекулой с получением мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными участками связывания и/или молекулами-мишенями; такие

мультиспецифические молекулы также предназначены для включения в термин "биспецифическая молекула", как используют в настоящем документе. Для получения биспецифической молекулы, описываемой в настоящем документе, антитело, описываемое в настоящем документе, можно функционально связывать (например, посредством химического связывания, генетического связывания, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающимися молекулами, такими как другие антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающийся миметик так, что получают биспецифическую молекулу.

Таким образом, по настоящему документу предоставлены биспецифические молекулы, обладающие по меньшей мере одной первой специфичностью связывания с CD40 и второй специфичностью связывания со вторым эпитопом-мишенью. В одном из вариантов осуществления, описываемом в настоящем документе, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно обладать третьей специфичностью связывания.

В одном из вариантов осуществления биспецифические молекулы, описываемые в настоящем документе, в качестве молекул, обеспечивающих специфичности связывания, содержат по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, включая, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, как описано в Ladner et al., патент США № 4946778, содержание которого явно включено в качестве ссылки.

Хотя предпочтительны моноклональные антитела человека, другими антителами, которые можно использовать в биспецифических молекулах, описываемых в настоящем документе, являются антитела мыши, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы, описываемые в настоящем документе, можно получать посредством конъюгации составляющих молекул, обуславливающих специфичности связывания, известными в данной области способами. Например, каждую обуславливающую специфичность связывания часть биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать друг с другом. Когда специфичности связывания обуславливают белки или пептиды, можно использовать ряд связывающих или сшивающих средств для ковалентной конъюгации. Примеры сшивающих средств включают белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-

фенилендималеинимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например, Karpovsky et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают способы, описанные в Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie et al. (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Предпочтительными средствами для конъюгации являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступные в Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичность связывания обуславливают антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильного связывания С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В особенно предпочтительном варианте осуществления шарнирную область модифицируют так, чтобы она перед конъюгацией содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один.

Альтернативно, обе специфичности связывания может кодировать одним вектором и экспрессировать и транслировать в одной клетке-хозяине. Этот способ особенно пригоден, когда биспецифическая молекула представляет собой mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или слитый белок лиганд×Fab. Биспецифическая молекула, описываемая в настоящем документе, может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую две детерминанты связывания. Биспецифическая молекулы может содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патентах США №№ 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать принятыми в данной области способами, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), анализ FACS, биоанализ (например, ингибирование роста) или анализ посредством вестерн-блоттинга. Как правило, каждым из этих анализов детектируют присутствие представляющих конкретный интерес комплексов белок-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного для представляющего интерес комплекса.

IX. Композиции

Дополнительно предоставлены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител к CD40 или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в настоящем документе, формулируемых вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут содержать одно или комбинацию (например, два или более различных) антител или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, описываемых в настоящем документе. Например, фармацевтическая композиция, описываемая в настоящем документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул), которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени или которые обладают комплементарной активностью.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит антитело к CD40 в концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл или 1-300 мг/мл или 100-300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описываемые в настоящем документе, также можно вводить в комбинированном лекарственном средстве, например, комбинированными с другими средствами. Например, комбинированное лекарственное средство может содержать антитело к CD40, описываемое в настоящем документе, комбинированное по меньшей мере с одним другим средством против злокачественной опухоли и/или стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки средством. Примеры терапевтических средств, которые можно использовать в комбинированном лекарственном средстве более подробно описаны ниже в разделе об использовании антител, описываемых в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления терапевтические композиции, описываемые в настоящем документе, могут содержать другие соединения, лекарственные средства и/или средства, используемые для лечения злокачественных опухолей. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать, например, химиотерапевтические лекарственные средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данную злокачественную опухоль. В некоторых случаях терапевтические композиции могут содержать, например, одно или несколько антител к CTLA-4, антител к PD-1, антител к PD-L1, антител к TIGIT, антител к OX40 (также известному как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L), антител к LAG-3, антител к CD73, антител к CD137, антител к CD27, антител к CSF-1R, агониста TLR или низкомолекулярных антагонистов IDO или TGF β .

Как используют в настоящем документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически приемлемыми. Предпочтительно, носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от маршрута введения активное соединение, например, антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, можно покрывать каким-либо материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описываемые в настоящем документе, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не обеспечивает никакого нежелательного токсикологического действия (см. например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Соли присоединения кислот включают соли, получаемые из нетоксических неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфорная и т.п., а также из нетоксических органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, получаемые из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описываемая в настоящем документе, также может содержать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеингидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы средства, такие как лимонная кислота,

этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описываемых в настоящем документе, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и инъеклируемые сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрывающих веществ, таких как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и посредством использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, средства для смачивания, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов можно обеспечивать посредством способов стерилизации, выше, и посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также желательным может являться включать в композиции средства придания изотоничности, такие как сахара, хлорид натрия и т.п.. Кроме того, пролонгированного всасывания инъеклируемой фармацевтической формы можно добиваться посредством включения средств, которые задерживают всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Использование таких сред и средства для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо общепринятые среды или средства несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях, описываемых в настоящем документе, предусмотрено. Также в композиции можно вводить дополнительные активные соединения.

Как правило, терапевтические композиции должны являться стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно формулировать в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий

полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрывающих веществ, таких как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и посредством использования поверхностно-активных веществ.

Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством введения требуемого количества активного соединения в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизации микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофильную сушку (лиофилизацию), посредством которых получают порошок активного ингредиента и любого требуемого дополнительного ингредиента из их ранее стерильно отфильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения лекарственной формы для однократного применения варьирует в зависимости от подлежащего лечению индивидуума и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения лекарственной формы для однократного применения, как правило, представляет собой количество композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество находится в диапазоне приблизительно от 0,01 процентов до приблизительно девяносто девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно приблизительно от 0,1 процентов до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно приблизительно от 1 процента до приблизительно 30 процентов активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования регулируют так, чтобы обеспечить оптимальный требуемый ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно проводить одно болюсное введение, можно вводить несколько дробных доз в течение определенного периода времени или дозу можно пропорционально снижать или увеличивать, как указывают требования терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно для простоты введения и единообразия дозировки формулировать парентеральные композиции в стандартные лекарственные формы. Как используют в настоящем

документе, стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз подлежащим лечению индивидуумам; где каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы обеспечивать требуемый терапевтический эффект, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Характеристики стандартной лекарственной формы, описываемой в настоящем документе, продиктованы и прямо зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который требуется достичь и (b) ограничений, характерных для области составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

При введении антитела диапазон дозы составляет от 0,0001 до 100 мг/кг и более, как правило, от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения включает введение раз в неделю, раз каждые две недели, раз каждые три недели, раз каждые четыре недели, раз в месяц, раз каждые 3 месяца или раз каждые 3-6 месяцев.

В определенных способах одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания, в случае чего доза каждого вводимого антитела находится в указанных диапазонах. Как правило, терапевтическое антитело вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут составлять, например, неделю, месяц, каждые три месяца или год. Интервалы также могут быть нерегулярными по показаниям определений уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В определенных способах дозу регулируют так, чтобы достичь концентрации антитела в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в определенных способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде состава с длительным высвобождением, в случае чего требуется менее частое введение. Доза и частота варьируют в зависимости от времени полужизни антитела у пациента. Как правило, наибольшее время полужизни демонстрируют антитела человека со следующими далее гуманизированными антителами, химерными антителами и не принадлежащими человеку антителами. Доза и частота введения могут варьировать в зависимости от того является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводят относительно низкую дозу с относительно длительными

интервалами в течение длительного периода времени. Определенные пациенты продолжают получать лечение в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом применении иногда необходимы относительно высокая доза с относительно короткими интервалами до снижения или прекращения прогрессирования заболевания, и предпочтительно до того, как пациент продемонстрирует частичное или полное снижение симптомов заболевания. Затем пациента необязательно можно переводить на профилактический режим, хотя при многих иммуноонкологических показаниях продолжение лечения не требуется.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описываемых в настоящем документе, могут варьировать так, чтобы получать количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретных пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций, описываемых в настоящем документе, или их сложных эфиров, солей или амидов, маршрут введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретной используемой композицией, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни (анамнез) подвергаемого лечению пациента и подобные факторы, хорошо известные в медицинской области.

"Терапевтически эффективная доза" антитела к CD40, описываемого в настоящем документе, предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и длительности периодов без проявления симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидизации вследствие заболевания. В контексте злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Симптомы злокачественной опухоли хорошо известны в данной области и включают, например, необычные характеристики невуса, изменение вида невуса, включая асимметрию, границу, цвет и/или диаметр, вновь пигментированную область кожи, аномальный невус, затемненная область под ногтем, уплотнения молочной железы, изменения сосков, кисты молочной железы, боли в молочной железе, смерть, потеря массы, слабость, избыточная усталость, трудности с приемом пищи, потеря аппетита, хронический кашель, затруднения

дыхания, отхаркивание крови, кровь в моче, кровь в стуле, тошнота, рвота, метастазы в печени, метастазы в легком, костные метастазы, ощущение переполнения желудка, метеоризм, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорация кишечника, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвота с кровью, сильное потение, лихорадка, высокое артериальное давление, анемия, диарея, желтуха, головокружение, озноб, мышечный спазм, метастазы в кишечнике, метастазы в легком, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, костные метастазы, метастазы в почке и метастазы в поджелудочной железе, затрудненное глотание и т.п. Терапевтическую эффективность можно определять непосредственно после первого введения агонистического mAb к huCD40 по настоящему изобретению, или ее можно наблюдать через определенные периоды времени и/или после серии доз. Отсроченную эффективность можно наблюдать только после нескольких месяцев лечения, вплоть до 6, 9 или 12 месяцев. В свете отсроченной эффективности, демонстрируемой определенными иммуноонкологическими средствами крайне важно преждевременно не принять решение об отсутствии терапевтической эффективности агонистического mAb к huCD40 по настоящему изобретению.

Терапевтически эффективная доза может предотвращать или задерживать начало злокачественной опухоли, так как может являться желательным, когда присутствуют ранние или ориентировочные признаки заболевания. Лабораторные тесты, используемые для диагностики злокачественных опухолей, включают химические (включая определения уровней растворимых CD40 или CD40L)(Hock et al. (2006) Cancer 106:2148; Chung & Lim (2014) J. Trans. Med. 12:102), гематологические, серологические и радиологические средства. Таким образом, для определения введения конкретного лечебного средства в терапевтически эффективной дозе для лечения злокачественной опухоли можно использовать любой клинический или биохимический анализ, который позволяет проводить мониторинг любого из указанного выше. Специалист в данной области может определять такие количества на основе таких факторов, как размеры индивидуума, тяжесть симптомов у индивидуума и конкретные выбранные композиция или маршрут введения.

Композицию, описываемую в настоящем документе, можно вводить одним или несколькими маршрутами введения одним или несколькими из множества известных в данной области способов. Как понятно специалисту в данной области, маршрут и/или способ введения варьирует в зависимости от необходимых результатов. Предпочтительные маршруты введения антител, описываемых в настоящем документе,

включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные маршруты введения, например, посредством инъекции или инфузии. Как используют в настоящем документе, фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, посредством инъекции, и в качестве неограничивающих примеров включает внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, интрадермальные, интраперитонеальные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, подкапсульные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и внутригрудинные инъекцию и инфузию.

Альтернативно, антитело, описываемое в настоящем документе, можно вводить посредством непарентерального маршрута, такого как местный, эпидермальный или слизистый маршруты введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно получать с носителями, которые защищают соединение от быстрого высвобождения, например, в составе с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Запатентовано или общеизвестно специалистам в данной области множество способов получения таких составов. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить медицинскими устройствами, известными в данной области. Например, в предпочтительном варианте осуществления терапевтическую композицию, описываемую в настоящем документе, можно вводить с использованием безыгольного инъекционного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, описываемые в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей для использования с антителами к huCD40, описываемыми в настоящем документе, включают: патент США № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для высвобождения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент

США № 4447233, в котором описан насос для инфузий лекарственных средств для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором описано имплантируемое инфузионное устройство с варьлируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства, содержащая компартменты с несколькими камерами; и патент США № 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ в качестве ссылки. Специалистам в данной области известно множество других таких имплантатов, систем доставки и модулей.

В определенных вариантах осуществления антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно формулировать для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает применение множества высокогидрофильных соединений. Для обеспечения пересечения терапевтическими соединениями, описываемыми в настоящем документе, пересечения BBB (при желании) их можно формулировать, например, в липосомы. Для обзора способов получения липосом, см., например, патенты США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одну или несколько молекул, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, таким образом, увеличивая направленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Иллюстративные направленные молекулы включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Средства Chemother. 39:180); рецептор поверхностно-активного белка A (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); также см. K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Х. Применения и способы

Антитела, композиции антител и способы, описываемые в настоящем документе, имеют большую пользу *in vitro* и *in vivo*, включая, например, усиление иммунного ответа, являясь агонистами передачи сигнала CD40. В предпочтительном варианте осуществления антитела, описываемые в настоящем документе, представляют собой антитела человека или гуманизированные антитела. Например, антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно вводить в клетки в культуре, *in*

vitro или *ex vivo*, или человеческим индивидуумам, например, *in vivo*, с усилением иммунитета при ряде заболеваний. Таким образом, по настоящему документу предоставлены способы модификации иммунного ответа у индивидуума, включающие введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описываемых в настоящем документе, так, что происходит усиление, стимуляция или повышение иммунного ответа у индивидуума.

Предпочтительные индивидуумы включают пациентов-людей, которым может потребоваться усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-люди с нарушением, которое можно лечить усилением иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа). В конкретном варианте осуществления способы особенно подходят для лечения злокачественной опухоли *in vivo*. Для достижения антигенспецифичного усиления иммунитета антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном или антиген может уже присутствовать у подлежащего лечению индивидуума (например, несущего опухоль или несущего вирус индивидуума). Когда антитела к CD40 вводят вместе с другим средством, их можно вводить раздельно или одновременно.

Также включены способы детекции присутствия антигена CD40 человека в образце или определения количества антигена CD40 человека, включающие приведение образца и контрольного образца в контакт с моноклональным антителом человека или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с CD40 человека, в условиях, которые обеспечивают формирование комплекса между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CD40 человека. Затем детектируют формирование комплекса, где различие формирования комплекса с образцом, сравниваемым с контрольным образцом, свидетельствует о присутствии антигена CD40 человека в образце. Кроме того, антитела к CD40, описываемые в настоящем документе, можно использовать для очистки CD40 человека посредством иммуноаффинной очистки.

Учитывая способность антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, усиливать костимуляцию Т-клеточных ответов, например, ответов антигенспецифичных Т-клеток, в настоящем документе предоставлены способы использования антител, описываемых в настоящем документе, *in vitro* и *in vivo* для стимуляции, усиления или повышения ответов антигенспецифичных Т-клеток, например, ответов противоопухолевых Т-клеток. Ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток можно

усиливать с использованием антител к CD40. Т-клетки могут представлять собой клетки $T_{\text{эфф}}$, например, $CD4^+$ клетки, $CD8^+$ клетки $T_{\text{эфф}}$, хелперные (T_h) Т-клетки и цитотоксические (T_c) Т-клетки.

Также включены способы усиления иммунного ответа (например, ответа антигенспецифичных Т-клеток) у индивидуума, включающие введение индивидууму антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, так, что иммунный ответ (например, ответ антигенспецифичных Т-клеток) у индивидуума усиливается. В предпочтительном варианте осуществления индивидуум представляет собой несущего опухоль индивидуума, и усиливают иммунный ответ против опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или опухоль жидких тканей, например, гемобластоз. В определенных вариантах осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В определенных вариантах осуществления опухоль является неиммуногенной. В определенных вариантах осуществления опухоль является PD-L1-позитивной. В определенных вариантах осуществления опухоль является PD-L1-негативной. Индивидуум также может представлять собой несущего вирус индивидуума, и усиливают иммунный ответ против вируса.

Также предоставлены способы ингибирования роста опухолевых клеток у индивидуума, включающие введение индивидууму антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, так, что происходит ингибирование роста опухоли у индивидуума. Также предоставлены способы лечения хронической вирусной инфекции у индивидуума, включающие введение индивидууму антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, так, что обеспечивается лечение хронической вирусной инфекции у индивидуума.

В определенных вариантах осуществления антитело к huCD40 вводят индивидууму в качестве дополнительной терапии. Лечение индивидуумов со злокачественными опухолями антителами к huCD40 может приводить к долгосрочному ответу относительно современного стандарта лечения; длительной продолжительности жизни сроком по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет, продолжительности жизни без рецидивов сроком по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. В определенных вариантах осуществления лечение индивидуума со злокачественной опухолью антителом к huCD40 предотвращает рецидив злокачественной опухоли или задерживает рецидив злокачественной опухоли, например, на 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Лечение антителами к CD40 можно использовать в качестве лечения первой или второй линии.

Эти и другие способы, описываемые в настоящем документе, более подробно описаны ниже.

Злокачественная опухоль

В настоящем документе предоставлены способы лечения индивидуума со злокачественной опухолью, включающие введение индивидууму антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, так, что обеспечивается лечение индивидуума, например, так, что происходит ингибирование или замедление роста злокачественной опухоли и/или что происходит регрессия опухоли. Антитело к huCD40 для ингибирования роста злокачественных опухолей можно использовать отдельно. Альтернативно, антитело к huCD40 можно использовать в сочетании с другим средством, например, другими иммуногенными средствами, стандартными средствами для лечения злокачественных опухолей или другими антителами, как описано ниже. Также предоставлена комбинация с ингибитором PD-1, таким как антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. См. например, Ellmark et al. (2015) OncoImmunology 4:7 e1011484.

Таким образом, в настоящем документе предоставлены способы лечения злокачественных опухолей, например, посредством ингибирования роста опухолевых клеток, у индивидуума, включающие введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, например, гуманизированного на основе 12D6, 5F11, 8E8, 5G7 или 19G3, или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело может представлять собой гуманизированное антитело к huCD40 (такое как любое из гуманизированных антител к huCD40, описываемых в настоящем документе), химерное антитело человека к huCD40 или гуманизированное не принадлежащее человеку антитело к huCD40, например, человеческое, химерное или гуманизированное антитело к huCD40, которое конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом что и по меньшей мере одно из антител к huCD40, конкретно описываемых в настоящем документе.

Злокачественные опухоли, рост которых можно ингибировать с использованием антител по изобретению, включают злокачественные опухоли, как правило реагирующие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легких (NSCLC), не NSCLC, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак яичника, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), рак

предстательной железы (например, не поддающуюся лечению гормонами аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейробластома, рак поджелудочной железы, глиобластома (мультиформную глиобластома), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак (или карциному) головы и шеи, рак желудка, опухоль половых клеток, детскую саркому, синоназальную опухоль из естественных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожную или внутриглазную злокачественную меланому), злокачественную опухоль кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному женских наружных половых органов, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, детские солидные опухоли, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазию центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинного мозга, глиому стволовой части мозга, гипофиз аденома, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные окружающей средой злокачественные опухоли, включая опухоли, индуцированные асбестом, связанные с вирусами злокачественные опухоли (например, связанную с вирусом папилломы человека (HPV) опухоль) и гематологические злокачественные новообразования, происходящие из любой из двух основных линий дифференцировки клеток крови, например, миелоидной линии клеток (которая дает гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной линии клеток (которая дает В-, Т-, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созревaniem клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитотидная В-клеточная лимфома,

лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома мантийных клеток, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфома предшественников Т-лимфобластов, Т-лимфобластная лимфома и лимфома/лейкоз (Т-Lbly/Т-ALL), лимфома периферических Т-клеток, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, истинная гистиоцитарный лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эффузионная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), опухоли гемопоэтического происхождения лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, лимфома предшественников В-лимфобластов, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая грибовидный микоз или синдром Сезари) и лимфоплазмацитоидная лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, вялотекущая миелома (также называемая медленно растущая миелома), солитарная плазмочитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), волосатоклеточная лимфома; опухоли гемопоэтического происхождения миелоидной линии, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральных и периферических нервов, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак и тератокарциному щитовидной железы, опухоли гемопоэтического происхождения лимфоидной линии, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая в качестве неограничивающих примеров Т-клеточные нарушения, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-PLL), включая мелкоклеточный и мозговидный тип клеток; лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (LGL) предпочтительно типа Т-клеток; a/d Т-NHL гепатолиенальную лимфому; периферическую/посттимическую Т-клеточную лимфому (плейоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных злокачественных

опухолей. Способы, описываемые в настоящем документе, также можно использовать для лечения метастатических злокачественных опухолей, не поддающихся лечению злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, не поддающихся лечению посредством предшествующей иммунотерапии, например, блокирующими антителами к CTLA-4 или PD-1) и рецидивирующих злокачественных опухолей.

Несмотря на указанное выше, агонистические антитела к huCD40 по настоящему изобретению не находят применения при лечении гематологических злокачественных опухолей с экспрессией CD40, которые могут обостряться при лечении агонистом CD40. Известно, что определенные злокачественные опухоли могут экспрессировать CD40 и, таким образом, подвергаться такому обострению, и, таким образом, их можно категорически исключить. В других вариантах осуществления образцы конкретных опухолей тестируют на экспрессию CD40 и исключают из терапии агонистическими антителами к huCD40 по настоящему изобретению на основе результатов тестирования.

Антитело к huCD40 можно вводить в качестве монотерапии или только в качестве иммуностимулирующей терапии, или его можно комбинировать с иммуногенным средством в стратегии с вакциной против злокачественной опухоли, таким как злокачественные клетки, выделенный опухолевый антиген (включая молекулы рекомбинантных белков, пептидов и углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно использовать, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF. Разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; также см. Restifo, N. and Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). В одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологических или аллогенных опухолевых клеток. Показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцированы для экспрессии GM-CSF. Показано, что GM-CSF является сильнодействующим активатором презентации

антигенов при противоопухолевой вакцинации. Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3539-43.

Исследование экспрессии генов и крупномасштабных профилей экспрессии генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов. Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7. Во многих случаях эти опухолеспецифичные антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессируемые в опухолях и в клетках, из которых происходит опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что более важно, можно показать, что многие из этих антигенов являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, выявляемых у хозяина. Агонисты CD40 можно использовать в сочетании с группой рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых опухолью, для формирования иммунного ответа на эти белки. Иммунная система в норме рассматривает эти белки как собственные антигены и, таким образом, толерантна к ним. Опухолевый антиген может включать белковую теломеразу, которая необходима для синтеза теломер хромосом и которая экспрессирована более чем в 85% злокачественных опухолях человека и только в ограниченном ряду соматических тканей (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). Опухолевые антигены также могут представлять собой "неоантигены", экспрессируемые в злокачественных клетках ввиду соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или приводят к образованию слитых белков между двумя несвязанными последовательностями (например, bcr-abl при филадельфийской хромосоме) или являются идиотип В-клеточных опухолей.

Другие опухолевые вакцины могут содержать белки вирусов, приводящих к злокачественным опухолям человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса саркомы Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифичного антигена, который можно использовать в сочетании с CD40 ингибирование, является очищенные белки теплового шока (HSP,) выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков опухолевых клеток и эти HSP являются высокоэффективными для доставки к антигенпрезентирующим клеткам для стимуляции противоопухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) представляют собой эффективные антигенпрезентирующие клетки, которые можно использовать для примирования

антигенспецифичного ответа. DC можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также можно генетическими способами трансдуцировать для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC с целью иммунизации также непосредственно сливали с опухолевыми клетками (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с агонистическим действием в отношении CD40 для активации (инициации) более сильных реакций против опухолей.

Также агонистическое действие в отношении CD40 можно комбинировать со стандартными способами лечения злокачественных опухолей (например, хирургией, радиацией и химиотерапией). Агонистическое действие в отношении CD40 можно эффективно комбинировать со химиотерапевтическими схемами. В этих случаях можно снижать дозу вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является антитело к huCD40 в комбинации с дакарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является антитело к huCD40 в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного использования агонистов CD40 и химиотерапии является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, приводит к увеличенным уровням опухолевого антигена в пути презентации антигена. Другие способы комбинированного лечения, которые могут приводить к синергии с агонистическим действием в отношении CD40 вследствие гибели клеток, представляют собой радиацию, хирургию и гормональная депривация. Каждый из этих протоколов обеспечивает источник опухолевого антигена у хозяина. Также с агонистами CD40 можно комбинировать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, что может обеспечивать поступление опухолевого антигена в пути презентации антигена у хозяина.

Антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, также можно использовать в комбинации с биспецифическими антителами, направленными к экспрессирующим рецепторы Fc α или Fc γ эффекторным клеткам к опухолевым клеткам (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно использовать для взаимодействия с двумя отдельными антигенами. Например, биспецифические антитела к рецептору Fc γ /к опухолевому антигену

(например, Her-2/neu) использовали для направления макрофагов в участки опухоли. Это направленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифичный ответ. Т-клеточное звено этого ответа можно дополнять агонистическим действием в отношении CD40. Альтернативно, используя биспецифические антитела, которые связываются с опухолевым антигеном и специфичным для дендритных клеток поверхностным клеточным маркером, можно доставлять антиген непосредственно к DC.

Опухоли избегают иммунологического надзора хозяина большим количеством механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть посредством инактивации иммуносупрессорных белков, экспрессируемых опухолями. Они наряду с другими включают TGF- β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200) и лиганд Fas (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно использовать в комбинации с антителами к huCD40 для противодействия иммуносупрессорам и поддержки противоопухолевого иммунного ответа хозяина.

Антитела к CD40 способны к эффективному замещению активности хелперных Т-клеток. Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478. Активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol. 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266), также могут обеспечивать увеличенные уровни активации Т-клеток. Также в сочетании с антителами к huCD40 можно использовать ингибиторы PD1 или PD-L1.

Также существуют несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают активацию и размножение антигенспецифичных Т-клеток *ex vivo* и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51). Эти способы также можно использовать для активации Т-клеточного ответа на возбудителей инфекции, таких как CMV. Активация *ex vivo* в присутствии антител к CD40 может увеличивать частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Хронические вирусные инфекции

В другом аспекте изобретение, описываемое в настоящем документе, относится к способу лечения инфекционного заболевания у индивидуума, включающему введение индивидууму антитела к huCD40 или его антигенсвязывающего фрагмента так, что происходит лечения инфекционного заболевания у индивидуума.

Подобно его использованию по отношению к опухолям, как указано выше, опосредуемое антителами агонистическое действие в отношении CD40 можно использовать отдельно или в качестве вспомогательного лечения в комбинации с вакцинами для усиления иммунного ответа на патогены, токсины и собственные антигены. Примеры патогенов, для которых может быть особенно пригоден этот терапевтический подход, включают патогены, для которых в настоящее время не существует эффективной вакцины, или патогены, для которых общепринятые вакцины эффективны менее, чем полностью. В качестве неограничивающих примеров они включают ВИЧ, вирусы гепатита (А, В, & С), гриппа, герпеса, лямблии, малярию, лейшманию, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Агонистическое действие в отношении CD40 особенно пригодно против развившихся инфекций этих возбудителей, таких как ВИЧ, который презентует измененные антигены в течение инфекции. Эти новые эпитопы на момент введения антител к CD40 человека распознаются как чужеродные, таким образом вызывая сильный Т-клеточный ответ.

Определенные примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами, описываемыми в настоящем документе, включают ВИЧ, вирусы гепатита (А, В, или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барр), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус лихорадки Денге, вирус папилломы, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Определенные примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами, описываемыми в настоящем документе, включают хламидии, риккетсиозные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серратию, псевдомонаду, легионеллу, возбудителя дифтерии, сальмонеллу, бациллы, возбудителей холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и бактерии-возбудители болезни лайма.

Определенные примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами, описываемыми в настоящем документе, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), род *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*,

Blastomyces dermatitidis, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Определенные примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению способами, описываемыми в настоящем документе, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, вид *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, вид *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

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

Адъюванты вакцин

Антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно использовать для усиления антигенспецифичного иммунного ответа посредством совместного введения антител к huCD40 с представляющим интерес антигеном, например, вакциной. Таким образом, по настоящему документу предоставлены способы усиления иммунного ответа на антиген у индивидуума, включающие введение индивидууму: (i) антигена и (ii) антитела к huCD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, так, что происходит усиление иммунного ответа индивидуума на антиген. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген патогенного микроорганизма. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, описываемые в приводимых выше разделах, такие как опухолевые антигены (или опухолевые вакцины), описываемые выше, или антигены вирусов, бактерий или других патогенных микроорганизмов, описанных выше.

Подходящие маршруты введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов), описываемых в настоящем документе, *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и специалисты могут их выбирать. Например, композиции антител можно вводить посредством инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие используемые дозы молекул зависят от возраста и массы индивидуума и концентрации и/или состава композиций антител.

Как описано ранее, антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно совместно вводить с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммуносуппрессирующим средством. Антитело можно связывать со средством (в виде иммунокомплекса) или можно вводить отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно со средством или можно совместно вводить с другими известными способами лечения, например, терапией злокачественной опухоли, например, радиацией. Такие терапевтические средства, наряду с другими, включают антинеопластические средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, сульфат блеомицина, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и циклофосфамидгидроксимочевину, которые самостоятельно эффективны только на уровнях, которые являются токсичными или субтоксичными для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз каждые 21 сутки. Совместное введение антител к CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов, описываемых в настоящем документе, с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два средства против злокачественных опухолей, которые действуют различными механизмами, приводящими к цитотоксическому действию на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы вследствие развития устойчивости к лекарственным средствам или изменения антигенности опухолевых клеток, которое может делать их нереакционноспособными с антителом.

Также в приводимый в настоящем документе объем входят наборы, содержащие композиции антител, описываемых в настоящем документе (например, антител человека, биспецифических или мультиспецифических молекул или иммуноконъюгатов) и инструкции по применению. Дополнительно набор может содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или оно или несколько дополнительных антител человека, описываемых в настоящем документе (например, антитело человека с комплементарной активностью, которое связывается с эпитопом антигена CD40, отличным от первого антитела человека). Как правило, наборы содержат ярлык, указывающий на предусмотренное применение содержимого набора. Термин ярлык включает любой документ или письменный материал, поставляемый на наборе или с ним или иным образом сопровождающий набор.

Способы комбинированного лечения

В дополнение к способам комбинированного лечения, предоставленным выше, антитела к CD40, описываемые в настоящем документе, также можно использовать при комбинированном лечении, например, при лечении злокачественной опухоли, как описано ниже.

Настоящее изобретение относится к способам комбинированного лечения, в которых антитело к huCD40 совместно вводят с одним или несколькими дополнительными средствами, например, антителами, которые эффективны для стимуляции иммунного ответа, таким образом, дополнительно усиливая, стимулируя или повышая иммунный ответ у индивидуума.

Как правило, антитело к huCD40, описываемое в настоящем документе, можно комбинировать с (i) агонистом другого костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на Т-клетках, каждый из которых приводит к амплификации ответа антигенспецифичных Т-клеток (регуляторы контрольных точек иммунного ответа). Большинство костимулирующих и коингибирующих молекул являются представителями суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и антитела к CD40, описываемые в настоящем документе, для усиления иммунного ответа можно вводить со средствами, которые направлены к представителям семейства IgSF. Одним из важных семейств мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другое семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с родственными представителями семейства рецептора TNF, которые включают CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

В другом аспекте антитела к huCD40 можно использовать в комбинации с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF), или других "иммуносупрессорных цитокинов"; или цитокинами, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимуляции иммунного ответа,

например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

В одном из аспектов Т-клеточный ответ можно стимулировать комбинацией mAb к huCD40 по настоящему изобретению и одного или нескольких из (i) антагонистов белков, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, ингибиторов контрольных точек иммунного ответа), таких как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и (ii) агонистов белков, которые стимулируют активацию Т-клеток, таких как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Иллюстративные средства, которые модулируют один из указанных выше белков и которые можно комбинировать с агонистическими антителами к huCD40, например, антителами, описываемые в настоящем документе, для лечения злокачественной опухоли, включают: ервой (YERVOY®)/ипилимумаб или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), пидилизумаб/CT-011 (к PD-1), кейтруду (KEYTRUDA®)/пембролизумаб/МК-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3 - WO 11/109400), IMP321 (к LAG-3), урелумаб/BMS-663513 и PF-05082566 (к CD137/4-1BB), varlilumab/CDX-1127 (к CD27), MEDI-6383 и MEDI-6469 (к OX40), RG-7888 (к OX40L - WO 06/029879), атацицепт (к TACI), муромонаб-CD3 (к CD3), ипилимумаб (к CTLA-4).

Другие молекулы, которые можно комбинировать с агонистическими антителами к huCD40 для лечения злокачественной опухоли включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK клетках. Например, агонистические антитела к huCD40 можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

Дополнительные средства для способов комбинированного лечения включают средства, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая в качестве неограничивающих примеров антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела к CSF-1R, включая RG7155 (WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или FPA-008 (WO 11/140249; WO 13/169264; WO 14/036357).

Как правило, агонистические антитела к huCD40, описываемые в настоящем документе, можно использовать вместе с одним или несколькими из агонистических средств, которые связывают положительные костимулирующие рецепторы, блокирующих средств, которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, и одним или несколькими средствами, которые системно усиливают частоту противоопухолевых Т-клеток, средствами которые преодолевают особые иммуносупрессорные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют вовлечение ингибирующих рецепторов (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют T_{reg} (например, с использованием моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или посредством истощения *ex vivo* с гранулами с антителом к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают анэргию или истощение Т-клеток) и средствами, которые инициируют активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в участках опухоли.

По настоящему документу предоставлены способы стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающие введение индивидууму агониста CD40, например, антитела, и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист PD-1, например, антагонистическое антитело, антагонист PD-L1, например, антагонистическое антитело, антагонист CTLA-4, например, антагонистическое антитело, и/или антагонист LAG3, например, антагонистическое антитело, так, что происходит стимуляция иммунного ответа у индивидуума, например, ингибирование роста опухоли, или стимуляция противовирусного ответа. В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят агонистическое антитело к huCD40 и антагонистическое антитело к PD-1. В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят агонистическое антитело к huCD40 и антагонистическое антитело к PD-L1. В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят агонистическое антитело к huCD40 и антагонистическое антитело к CTLA-4. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое антитело к PD-1, антагонистическое антитело к PD-L1, антагонистическое антитело к CTLA-4 и/или антагонистическое антитело к LAG3) представляет собой антитело человека. Альтернативно, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, получаемое из антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и/или антитела к LAG3 мыши).

По настоящему документу предоставлены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и антагонистического антитела к PD-1. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к huCD40 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-1 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе, где указание "субтерапевтическая" относится к монотерапии указываемым средством. Также по настоящему документу предоставлены способы изменения неблагоприятных побочных эффектов, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и субтерапевтической дозы антитела к PD-1. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, а агонистическое антитело к huCD40 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области антител, описываемых в настоящем документе.

Подходящие для применения в способах, описываемых в настоящем документе, антагонисты PD-1 в качестве неограничивающих примеров включают лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифические антитела) и поливалентные средства. В одном из вариантов осуществления антагонист PD-1 представляет собой слитый белок, например, слитый с Fc белок, такой как AMP-244. В одном из вариантов осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1.

Иллюстративное антитело к PD-1 представляют собой опдиво (OPDIVO®)/ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или переменные области одного из 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в WO 2006/121168. В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой МК-3475 (Кейтруда (KEYTRUDA®)/пембролизумаб/ранее ламбролизумаб), описанное в WO 2012/145493; AMP-514/MEDI-0680, описанное в WO 2012/145493; и CT-011 (пидилизумаб; ранее CT-AcTibody или BAT; см., например, Rosenblatt et al. (2011) J. Immunotherapy 34:409). Дополнительные известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают антитела и ингибиторы, описанные в WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO

2012/145493, патентах США №№ 7635757 и 8217149 и патентной публикации США № 2009/0317368. Также можно использовать любое из антител к PD-1, описанных в WO 2013/173223. Также в комбинированном лечении можно использовать антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из этих антител.

В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 связывается с PD-1 человека с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с PD-1 человека с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с PD-1 человека с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с PD-1 человека с K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

По настоящему документу предоставлены способы лечения гиперпролиферативных заболеваний (например, злокачественных опухолей), включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и антагонистического антитела к PD-L1. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к huCD40 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. По настоящему документу предоставлены способы изменения неблагоприятных побочных эффектов, ассоциированных с лечением гиперпролиферативных заболеваний иммуностимулирующим средством, включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и субтерапевтической дозы антитела к PD-L1. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, а агонистическое антитело к huCD40 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области антител, описываемых в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (указанное в WO 2007/005874 и патенте США № 7943743 как 12A4), MSB0010718C (WO 2013/79174) или антитело, которое содержит CDR или переменные области 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в публикации PCT WO 07/005874 и патенте США № 7943743. В определенном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как антитело к B7-H1) или MPDL3280A (также известное как RG7446). Также можно использовать любое из антител к PD-L1, описанных в WO 2013/173223, WO 2011/066389, WO 2012/145493, патентах США №№ 7635757 и

8217149 и публикации США № 2009/145493. Также в комбинированном лечении можно использовать антитела к PD-L1, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом что и любое из этих антител.

В дополнительном варианте осуществления агонистическое антитело к huCD40 по настоящему изобретению комбинируют с антагонистом передачи сигнала PD-1/PD-L1, таким как антагонист PD-1 или антагонист PD-L1, в комбинации с третьим иммунотерапевтическим средством. В одном из вариантов осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагонист GITR или антагонист OX-40, такие как антитела к GITR или антитела к OX40, описываемые в настоящем документе.

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое антитело к GITR. Подходящие антитела к GITR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116) и MK-4166 (WO 11/028683).

В другом аспекте иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод или NLG-919 (WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237).

По настоящему документу предоставлены способы лечения гиперпролиферативных заболеваний (например, злокачественных опухолей), включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40, описываемого в настоящем документе, и антагонистического антитела к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления агонистическое антитело к huCD40 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе, где указание "субтерапевтическая" относится к монотерапии указываемым средством. По настоящему документу предоставлены способы изменения неблагоприятных побочных эффектов, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из: ервоя (YERVOY®) (ипилиумаба или антитела 10D1, описанного в публикации PCT WO 01/14424), тремелиумаба (ранее тицилиумаб, CP-675,206) и

антител к CTLA-4, описанных в следующих публикациях: WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Также можно использовать любое из антител к CTLA-4, описанных в WO 2013/173223.

По настоящему документу предоставлены способы лечения гиперпролиферативных заболеваний (например, злокачественных опухолей), включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и антитела к LAG-3. В дополнительных вариантах осуществления агонистическое антитело к huCD40 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. По настоящему документу предоставлены способы изменения неблагоприятных побочных эффектов, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 и субтерапевтической дозы антитела к LAG-3. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления антитело к LAG-3 представляет собой моноклональное антитело с последовательностью человека, а агонистическое антитело к huCD40 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области антител, описываемых в настоящем документе. Примеры антител к LAG3 включают антитела, содержащие CDR или переменные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в патентной публикации США № US 2011/0150892 и WO 2014/008218. В одном из вариантов осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие принятые в данной области антитела к LAG-3, которые можно использовать, включают IMP731, описанное в US 2011/007023. Также можно использовать IMP-321. Также в комбинированном лечении можно использовать антитела к LAG-3, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител.

В определенных вариантах осуществления антитело к LAG-3 связывается с LAG-3 человека с K_D 5×10^{-8} М или менее, связывается с LAG-3 человека с K_D 1×10^{-8} М или менее, связывается с LAG-3 человека с K_D 5×10^{-9} М или менее или связывается с LAG-3 человека с K_D от 1×10^{-8} М до 1×10^{-10} М или менее.

Введение агонистических антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, и антагонистов, например, антагонистических антител, одной или

нескольких вторичных антигенов-мишеней, таких как LAG-3, и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1 может усиливать у пациента иммунный ответ к злокачественным клеткам. Злокачественные опухоли, рост которых можно ингибировать с использованием антител по настоящему описанию, включают злокачественные опухоли, как правило отвечающие на иммунотерапию. Характерные примеры злокачественных опухолей для лечения посредством комбинированного лечения по настоящему описанию включают злокачественные опухоли, конкретно перечисленные выше при описании монотерапии агонистическими антителами к huCD40.

В определенных вариантах осуществления комбинацию терапевтических антител, описываемых в настоящем документе, можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе, или одновременно в виде отдельных композиций с каждым из антител в фармацевтически приемлемом носителе. В другом варианте осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и агонистическое антитело к huCD40 можно вводить последовательно, например, антитело к CTLA-4 можно вводить первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, или агонистическое антитело к huCD40 можно вводить первым, а антитело к CTLA-4 вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-1 и агонистическое антитело к huCD40 можно вводить последовательно, например, антитело к PD-1 можно вводить первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, или агонистическое антитело к huCD40 можно вводить первым, а антитело к PD-1 вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-L1 и агонистическое антитело к huCD40 можно вводить последовательно, например, антитело к PD-L1 можно вводить первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, или агонистическое антитело к huCD40 можно вводить первым, а антитело к PD-L1 вторым. Дополнительно или альтернативно, антитело к LAG-3 и агонистическое антитело к huCD40 можно вводить последовательно, например, антитело к LAG-3 можно вводить первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, или агонистическое антитело к huCD40 можно вводить первым, а антитело к LAG-3 вторым.

Кроме того, если последовательно вводят более одной дозу комбинированного препарата, в каждый момент введения порядок последовательного введения можно обращать или сохранять тот же порядок, последовательные введения можно комбинировать с одновременными введениями или проводить любое их сочетание. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и агонистического

антитела к huCD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, где антитело к CTLA-4 является первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, а третье введение может быть последовательным, где агонистическое антитело к huCD40 является первым, а антитело к CTLA-4 вторым, и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-1 и агонистического антитела к huCD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, где антитело к PD-1 является первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, а третье введение может быть последовательным, где агонистическое антитело к huCD40 является первым, а антитело к PD-1 вторым, и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-L1 и агонистического антитела к huCD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, где антитело к PD-L1 является первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, а третье введение может быть последовательным, где агонистическое антитело к huCD40 является первым, а антитело к PD-L1 вторым, и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к LAG-3 и агонистического антитела к huCD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, где антитело к LAG-3 является первым, а агонистическое антитело к huCD40 вторым, а третье введение может быть последовательным, где агонистическое антитело к huCD40 является первым, а антитело к LAG-3 вторым, и т.д. Другой характерный режим дозирования может включать первое введение, которое является последовательным, где агонистическое антитело к huCD40 является первым, а антитело к CTLA-4 (и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3) вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

Необязательно, агонистическое антитело к huCD40 в виде единственного иммунотерапевтического средства или комбинацию агонистического антитела к huCD40 и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) можно дополнительно комбинировать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, выделенные опухолевые антигены (включая молекулы рекомбинантных белков, пептидов и углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно использовать, включают пептиды антигенов меланомы, такие как

пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу или опухолевые клетки, для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно описано ниже). Агонист CD40 и одно или несколько дополнительных антител (например, блокатор CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) также можно дополнительно комбинировать со стандартным лечением злокачественных опухолей. Например, агонист CD40 и одно или несколько дополнительных антител (например, блокаторов CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно эффективно комбинировать со схемами химиотерапевтического лечения. В этих случаях можно снижать дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией по настоящему описанию (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация агонистического антитела к CD40 с или без и дополнительного антитела, такого как антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) дополнительно в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером является комбинация агонистического антитела к huCD40 с или без и антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител LAG-3 дополнительно в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного использования агонистического действия в отношении CD40 и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличенным уровням опухолевого антигена в пути презентации антигенов. Другие способы комбинированного лечения, которые могут приводить к синергии с комбинированным агонистическим действием в отношении CD40 с или без и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 вследствие гибели клеток, включают радиацию, хирургию или гормональную депривацию. Каждый из этих протоколов приводит к образованию источника опухолевого антигена у хозяина. Также с комбинированным агонистическим действием в отношении CD40 и блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 можно комбинировать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, что может являться источником поступления опухолевого антигена в пути презентации антигена хозяина.

Агонистическое антитело к huCD40 в виде единственного иммунотерапевтического средства или комбинации агониста CD40 и блокирующих антител к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3 также можно

использовать в комбинации с биспецифическими антителами, направленными к экспрессирующим рецепторы Fc α или Fc γ эффекторным клеткам к опухолевым клеткам. См., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243. Биспецифические антитела можно использовать для взаимодействия с двумя различными антигенами. Т-клеточное звено этого ответа можно дополнять использованием комбинированных агонистического действия в отношении CD40 и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В другом примере агонистическое антитело к CD40 в виде единственного иммунотерапевтического средства или комбинации антитела к CD40 и дополнительного иммуностимулирующего средства, например, антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или средства против LAG-3, например, антитела, можно использовать в сочетании с антителом к неоплазии, таким как ритуксан® (ритуксимаб), герцептин® (трастузумаб), бексар® (тозитумомаб), зевалин® (ибритумомаб), кэмпас® (алемтузумаб), лимфоцид® (пертузумаб), авастин® (бевацизумаб) и тарцева® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера, и не желая быть связанным теорией, лечение антителом к злокачественной опухоли или антителом к злокачественной опухоли, конъюгированным с токсином, может приводить к гибели злокачественных клеток (например, опухолевых клеток), что может усиливать иммунный ответ, опосредуемый иммуностимулирующим средством, например, средством против CD40, TIGIT, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например, антителом. В иллюстративном варианте осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать средство против злокачественных опухолей, например, антитело, в комбинации с агонистическим антителом к huCD40 и, необязательно, дополнительное иммуностимулирующее средство, например, антитело к CTLA-4 и/или антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1 и/или средство против LAG-3, например, антитело, одновременно или последовательно или в любом их сочетании, которое может усиливать противоопухолевый иммунный ответ хозяина.

По настоящему документу предоставлены способы изменения неблагоприятных побочных эффектов, ассоциированных с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) иммуностимулирующим средством, включающие введение индивидууму агонистического антитела к huCD40 с или без и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или средства против LAG-3, например, антитела. Например, способы, описываемые в

настоящем документе, обеспечивают способ снижения частоты случаев индуцированных иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи посредством введение пациенту невсасываемого стероида. Как используют в настоящем документе, "невсасываемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, который демонстрирует интенсивный пресистемный метаболизм так, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, например, менее чем приблизительно 20%. В одном из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, невсасываемый стероид представляет собой будезонид. Будезонид представляет собой местнодействующий глюкокортикостероид, который после перорального введения интенсивно метаболизируется, преимущественно печенью. Энтокорт ЕС® (Astra-Zeneca) представляет собой зависимый от pH и времени пероральный состав будезонида, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по всей толстой кишке. Энтокорт ЕС® одобрен в США для лечения болезни Крона в степени от легкой до умеренной, с поражением подвздошной и/или восходящей ободочной кишки. Обычная пероральная доза энтокорта ЕС® для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/сутки. Энтокорт ЕС® высвобождается в кишечнике с последующим всасыванием и удержанием в слизистой кишечника. После его прохождения через ткань-мишень слизистую кишечника, энтокорт ЕС® интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, его биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будезонида приводит к улучшенному терапевтическому отношению по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее интенсивным пресистемным метаболизмом. Будезонид приводит к меньшим неблагоприятным эффектам, включая меньшую супрессию гипоталамо-гипофизарной системы, чем у системно действующих кортикостероидов. Однако продолжительное введение энтокорта ЕС® может приводить к системному глюкокортикоидному действию, такому как гиперкортицизм и супрессия надпочечников. См. PDR 58th ed. 2004; 608-610.

В дополнительных вариантах осуществления агонист CD40 с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 (например, иммуностимулирующими терапевтическими антителами к CD40 и необязательно антителами к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) или без нее в сочетании с невсасываемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают средства 5-ASA, например, такие как: сульфасалазин (азульфидин®),

Pharmacia & UpJohn); олсалазин (дипентум®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (колазал®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и месаламин (асакол®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; пентаза®, Shire US; каназа®, Axcan Scandipharm, Inc.; роваза®, Solvay).

В соответствии со способами, описываемыми в настоящем документе, салицилат, вводимый в комбинации с агонистическим антителом к huCD40 с антителом к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3 или без и невсасываемым стероидом, может включать любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и невсасываемого стероида с целью снижения частоты случаев колита, индуцируемого иммуностимулирующими антителами. Таким образом, например, способы снижения частоты случаев колита, индуцируемого иммуностимулирующими антителами, описываемые в настоящем документе, включают введение салицилата и невсасываемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 часов после невсасываемого стероида) или в любом их сочетании. Кроме того, салицилат и невсасываемый стероид можно вводить одним и тем же маршрутом (например, оба вводят перорально) или различными маршрутами (например, салицилат вводят перорально, а невсасываемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от маршрута(ов), используемых для введения антител к huCD40 и антител к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3.

Агонистические антитела к huCD40 и лечебные средства с комбинацией антител, описываемые в настоящем документе, также можно использовать в сочетании с другими хорошо известными лечебными средствами, которые выбраны по их конкретной применимости против подвергаемого лечению показания (например, злокачественной опухоли). Комбинации агонистических антител к huCD40, описываемых в настоящем документе, можно использовать с известным фармацевтически приемлемым средством(ами) последовательно.

Например, агонистические антитела к huCD40 и лекарственные средства с комбинацией антител, описываемые в настоящем документе, можно использовать в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным лечением, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина-паклитаксела (таксола), доксорубина, 5-fu или камптотецина + аро2L/TRAIL (6X комбо)), одного или нескольких ингибиторов протеасом (например, бортезомиба или MG132), одного или

нескольких ингибиторов Bcl-2 (например, BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибитора индоламиндиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (производное R-(-)-госсипола), ABT-263 (низкомолекулярного соединения), GX-15-070 (обатоклакса) или антагонистов MCL-1 (белка дифференцировки миелолейкозных клеток-1)), антагонистов iAP (ингибитора белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярного миметика smac, синтетических пептидов smac (см. Fulda et al., Nat Med 2002; 8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторов HDAC (гистондеацетилазы), антител к CD20 (например, ритуксимаба), ингибиторов ангиогенеза (например, бевацизумаба), антиангиогенных средств, направленных на VEGF и VEGFR (например, авастина®), синтетических тритерпеноидов (см. Hye et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторов c-FLIP (клеточный ингибирующий FLICE белок) (например, природных и синтетических лигандов PPAR γ (активируемого пролифератором пероксисом рецептора γ), 5809354 или 5569100), ингибиторов киназ (например, сорафениба), трастузумаба, цетуксимаба, темсиролимуса, ингибиторов mTOR, таких как рапамицин и темсиролимус, бортезомиба, ингибиторов JAK2, ингибиторов HSP90, ингибиторов PI3K-AKT, леналидомида, ингибиторов GSK3 β , ингибиторов IAP и/или генотоксичных лекарственных средств.

Агонистические антитела к huCD40 и лекарственные средства с комбинацией антител, описываемые в настоящем документе, можно дополнительно использовать в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно использовать в качестве антипролиферативных цитотоксических средств в качестве неограничивающих примеров включают следующие:

Алкилирующие средства (включающие без ограничения азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевину и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (цитоксанTM) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентифосфамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включающие без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, фосфат флударабина, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинации с агонистическими антителами к huCD40 без ограничения включают таксаны,

паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как таксол™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезокисэпотилон В1, [17]-дегидродезокисэпотилон В, [18]дегидродезокисэпотилоны В, С12.13-циклопропилэпотилон А, С6-С8 мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, АBJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (гидрохлорид тасидотина), галихондрин В, эрибулин мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТI-286), Е-7974, криптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтанзиноидов (DM-1), MKC-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиb), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомоэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, а также другие стабилизаторы микротрубочек, известные в данной области.

В случаях, когда в сочетании или до лечения агонистическими антителами к huCD40, описываем в настоящем документе, необходимо перевести аберрантно пролиферирующие клетки в состояние покоя, пациенту также можно вводить гормоны и стероиды (включая их синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстилбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, пропионат дромостанолонa, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, золадекс™. При использовании способов или композиций, описываемых в настоящем документе, также по необходимости можно вводить другие средства, используемые при модуляции роста или метастазирования опухолей в клинических условиях, такие как антимиометики.

Специалистам в данной области известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в Physicians' Desk Reference (PDR), например, издания 1996 года (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Введение химиотерапевтических средств(а) и/или лучевую терапию можно проводить по терапевтическим протоколам, хорошо известным в данной области. Специалистам в данной области очевидно, что проведение введения химиотерапевтических средств(а) и/или лучевой терапии может варьировать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известного действия химиотерапевтических средств(а) и/или лучевой терапии на это заболевание. Также клиницистам известно, что варьировать могут терапевтические протоколы (например, величины доз и времена введения), учитывая наблюдаемое действие вводимых терапевтических средств на пациента и учитывая наблюдаемую реакцию заболевания на вводимые терапевтические средства.

XI. Характеристика специфических агонистических антител к CD40 по настоящему изобретению

Агонистические антитела к CD40 по настоящему изобретению получали, как описано в примере 1. Вариабельные домены и области последовательностей CDR иллюстративных антител по настоящему изобретению предоставлены в списке последовательностей и приведены в таблице 2. Нумерация вариабельных доменов и областей CDR является одинаковой для всех антител, происходящих из одного исходного клона, например, гуманизированные варианты, предоставляемые в настоящем разделе, не содержат никаких вставок или делеций.

ТАБЛИЦА 2

Вариабельные домены и CDR антител

Клон	Цепь	Вариабельный домен	CDR1	CDR2	CDR3
12D6	Тяжелая цепь	1-119	31-35	50-66	99-108
12D6	Легкая цепь	1-112	24-39	55-61	94-102
5F11	Тяжелая цепь	1-117	31-35	50-66	99-106
5F11	Легкая цепь	1-111	24-38	54-60	93-101
8E8	Тяжелая цепь	1-122	31-35	50-66	99-111
8E8	Легкая цепь	1-112	24-39	55-61	94-102
5G7	Тяжелая цепь	1-113	31-35	50-66	99-102
5G7	Легкая цепь	1-107	24-34	50-56	89-97
19G3	Тяжелая цепь	1-112	31-35	50-66	99-101
19G3	Легкая цепь	1-112	24-39	55-61	94-102

Изобретение также относится к антителам к huCD40, родственным антителам, описываемым в настоящем документе посредством последовательности, в силу происхождения из тех же последовательностей зародышевой линии мыши, конкретно генных сегментов областей V и J. Последовательности зародышевых линий мыши для каждого из антител, описываемых в настоящем документе, предоставлены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3

Последовательности зародышевых линий мыши для mAb к huCD40

Clone	Цепь	V-область	J-область
12D6	Тяжелая цепь	VH1-39_01	IGHJ4
12D6	Легкая цепь	VK1-110_01	IGKJ1
5F11	Тяжелая цепь	VH1-4_02	IGHJ3
5F11	Легкая цепь	VK3-5_01	IGKJ5
8E8	Тяжелая цепь	VH1-80_01	IGHJ2
8E8	Легкая цепь	VK1-110_01	IGKJ2
5G7	Тяжелая цепь	VH1-18_01	IGHJ4
5G7	Легкая цепь	VK10-96_01	IGKJ2
19G3	Тяжелая цепь	VH5-9-4_01	IGHJ3
19G3	Легкая цепь	VK1-117_01	IGKJ2

Изобретение также относится к гуманизированным антителам к huCD40, получаемым из исходных антител мыши, описываемых в настоящем документе, посредством замены каркасных последовательностей мыши каркасными последовательностями человека с дополнительными мутациями ("обратными мутациями") с восстановлением аффинности к антигену (CD40 человека), которая в ином случае может утрачиваться при гуманизации или с удалением подвижностей последовательности, или без. См. пример 3.

Изобретение также относится к конструкциям антител, содержащим новые последовательности вариабельных доменов, описываемые в настоящем документе, и константные домены с модифицированными Fc-областями с увеличенной аффинностью к FcγRIIb по сравнению с их аффинностью к другим рецепторам Fc, например, активирующим рецепторам. Полагают, что такие агонистические антитела к

huCD40 с увеличенной специфичностью к FcγRIIb проявят превосходную эффективность при лечении злокачественных опухолей и хронических инфекций. Li & Ravetch (2011) Science 333:1030; White et al. (2011) J. Immunol. 187:1754. Практически, такие специфичные к FcγRIIb агонистические mAb к CD40 могут проявлять усиленное адьювантное действие, увеличивая созревание дендритных клеток, стимулируя размножение и активацию цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, что приводит к увеличенному противоопухолевому ответу. Там же. Практически, опосредованное FcR усиление сигнала агонистических антител к CD40 вследствие увеличенной кластеризации или "сшивания" рецепторов по настоящему изобретению может являться основной составной частью терапевтической эффективности. Сшивание агонистических антител к CD40 посредством взаимодействия FcR с Fc-областью антитела может увеличивать силу сигнала и, таким образом, увеличивать активацию клеток.

Относительную аффинность связывания антител к активирующим (A) по сравнению с ингибирующими (I) рецепторам Fc можно выражать в виде отношения "A/I", и, как правило, она является функцией структуры Fc-области антитела IgG. См. WO 2012/087928. Антитела с увеличенной специфичностью связывания с ингибирующим рецептором FcγRIIb обладают более низкими отношениями A/I. Предпочтительные антитела в качестве агонистических антител к huCD40 по настоящему изобретению обладают отношениями A/I, например, менее 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,1, 0,05, 0,03 или 0,01.

Константные домены IgG1 человека, содержащие мутации для увеличения специфичности к FcγRIIb, также предоставлены в списке последовательностей и приведены в таблице 4 и проиллюстрированы на фиг. 1. Варианты последовательностей определены по отношению к последовательности константного домена IgG1f человека, приведенной в SEQ ID NO:65. Номенклатура в отношении положений (нумерация) мутаций в Fc-области приведена в соответствии с индексом EU, как в Kabat et al. (1981) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), что облегчает сравнение последовательностей Fc в эквивалентных положениях в антителах с различными длинами вариабельных доменов. Edelman et al. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78; WO 2012/130831 (с использованием той же системы нумерации). Она не соответствует нумерации в последовательностях в списке последовательностей. На фиг. 1 приведено графическое представление вариантов последовательностей Fc из таблицы 4, на

основании которого специалист в данной области может легко установить соответствующие положения в последовательностях антител, описываемых в настоящем документе. Варианты SE и SELF описаны в Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926. Варианты P238D, V4, V7, V8, V9, V11 и V12 описаны в Mimoto et al. (2013) Protein Engineering Design & Selection 26:589 (например, в таблице 1 в ней).

ТАБЛИЦА 4

Варианты последовательностей Fc

Название варианта	SEQ ID:	Варианты последовательностей								
IgG1f	65									
SE	66				S267E					
SELF	67				S267E				L328F	
P238D	68			P238D						
V4	69			P238D				P271G		
V4-D270E	70			P238D			D270E	P271G		
V7	71	E233D		P238D				P271G		A330R
V8	72		G237D	P238D		H268D		P271G		
V9	73		G237D	P238D				P271G		A330R
V9-D270E	74		G237D	P238D			D270E	P271G		A330R
V11	75		G237D	P238D		H268D		P271G		A330R
V12	76	E233D	G237D	P238D		H268D		P271G		A330R

В Yu et al. (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:9723 (и WO 2014/184545) описаны дополнительные варианты последовательностей Fc с увеличенной аффинностью к FcγRIIb, включая V262E и V264E, например, для применения в комбинации с S267E и L328F.

Получали дополнительные варианты с мутациями D270E для снижения изомеризации D270, которая происходила в вариантах последовательностей Fc V4 и V9, которые в ином случае демонстрировали увеличенные скорости изомеризации в исследованиях ускоренной деградации с прогнозом ≈12-16% изомеризации через два

года при 4°C в PBS по сравнению с $\approx 5\text{-}7\%$ для других вариантов. См. таблицу 5 (в которой приведены данные одного эксперимента, но повторные эксперименты демонстрировали сравнимые значения). Замена аспарагиновой кислоты в положении 270 глутаминовой кислотой устраняет возможность такой изомеризации DG, что приводит к антителам, которые являются химически более стабильными, и препаратам антител, которые являются более гомогенными. Другие замены D270 в V9, такие как D270A, D270Q, D270S и D270T, эффективно устраняют связывание с рецепторами FcγRIIa и FcγRIIb (K_D составляла более 5 мкМ). Хотя мутация D270E снижает связывание с рецептором FcγRIIb на порядок, вариант V9-D270E сохранял благоприятное смещение аффинности в отношении рецептора FcγRIIb по сравнению с FcγRIIa и приемлемую абсолютную аффинность к FcγRIIb. См. пример 8.

ТАБЛИЦА 5

Аффинность вариантов последовательностей Fc к рецепторам Fcγ
(K_D в нМ)

Обозначение	FcγRIIa-H131	FcγRIIa-R131	FcγRIIb
IgG1f	530	850	3900
SE	520	22	98
SELF	1100	2	11
P238D	>5000	>5000	950
V4	>5000	1900	150
V4 - D270E	>5000	>5000	1800
V7	>5000	1600	84
V8	>5000	1400	93
V9	>5000	420	15
V9-D270A,Q,S,T	>5000	>5000	>5000
V9-D270E	>5000	>5000	150
V11	-	450	15
V12	>5000	490	21

Определяли агонистическую активность различных антител к CD40 по настоящему изобретению. См. пример 7 и фиг. 3А, 3В и 4. Выявлено, что агонистическая активность зависит от обеих последовательностей переменных

доменов (номера клона mAb), которые определяют связывание антигена (CD40 человека) и последовательности Fc-области, которая определяет связывание рецептора Fc (FcγRIIb).

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано приводимыми ниже примерами, которые не следует рассматривать в качестве дополнительного ограничения. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательности Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые на всем протяжении настоящей заявки явно включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Примеры

ПРИМЕР 1

Получение моноклональных антител мыши к CD40 человека

Моноклональные антитела мыши к CD40 человека получали с использованием мышей дикого типа Balb/c (Charles Rivers Labs), экспрессирующих гены антител мыши, как указано ниже.

Антиген

В качестве антигена для иммунизации использовали растворимый рекомбинантный белок huCD40-muFc. M_w растворимого слитого белка составляла 91,6 кДа и он состоит из внеклеточной части huCD40, связанной на своем С-конце с Fc IgG2b мыши. Этот слитый белок обозначают в настоящем документе как "слитый белок huCD40-muFc". Слитый белок получали стандартными способами рекомбинантных ДНК и экспрессировали в трансфицированных клетках CHO, которые секретируют растворимый слитый белок в супернатант культуры. Клетки-хозяева CHO, используемые для трансфекции, получали в Invitrogen (каталожн. № 11619-012). Секретируемый растворимый слитый белок выделяли для применения в качестве иммуногена.

Иммунизация мышей

Для получения моноклональных антител мыши к CD40 человека мышей Balb/c иммунизировали выделенным слитым белком huCD40-muFc. Возраст мышей при первой инфузии антигена составлял приблизительно 2-4 месяца. Препарат выделенного рекомбинантного антигена huCD40-muFc (10 мкг, выделенных из трансфицированных клеток млекопитающих, экспрессирующих слитый белок) использовали для иммунизации мышей с использованием двух протоколов иммунизации (А и В). Протокол А состоял из четырех еженедельных иммунизаций в подушку стопы (FP), а

протокол В состоял из семи еженедельных подкожных (п/к)/интраперитонеальных(и/п)/подколенных иммунизаций. В обоих случаях иммуноген смешивали 1:1 с адъювантом RIBI (Sigma, каталожный № M6536).

У всех мышей через неделю после четвертой иммунизации получали кровь для анализа титров антигенспецифичных антител. у каждой мыши также проводили конечные заборы крови в момент умерщвления. Иммунный ответ контролировали посредством ретроорбитального кровотоечения. Плазму подвергали скринингу посредством анализа ELISA с использованием рекомбинантного белка, используемого для иммунизации. Мышей после протокола А вводили две конечные бустерные инъекции внутривенно (в/в) и в подушечку стопы (FP) с использованием растворимого антигена на сутки -2 и -3 перед слиянием. Мышам после протокола В вводили две конечные бустерные инъекции внутривенно, а также IP и под колено с использованием растворимого антигена на сутки -2 и -3 перед слиянием.

Всех четырех мышей после протокола А (ID 291763, 291764, 291765, 291766) умерщвляли. Выделяли клетки лимфоузлов и селезенки и смешивали для слияния (слияния 3582 и 3583). После протокола В умерщвляли только две мыши (ID 294286 и 294288). Селезенку и лимфоузлы каждой мыши смешивали и сливали (слияния 3716 и 3717).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к CD40 человека

Спленоциты и лимфоузлы мышь, выделенные у мышей Balb/c с высоким титром, сливали с партнером по слиянию миеломой мыши с использованием электрического поля с использованием устройства для электрослияния Hybri-mune и большой камеры для слияния 0,9 мл (BTX Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA). Суспензии единичных лимфоцитов иммунизированных мышей сливали с равным количеством несекретирующих миеломных клеток мышей P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580). Полученные клетки высевали при $2,0 \times 10^4$ клеток/лунку в плоскодонные планшеты для микротитрования в селективную среду ClonaCell-HY Medium E (каталожн. № 03805; STEMCELL Technologies Inc., Vancouver BC, Canada) с добавлением аминоптерина для отбора гибридом. Приблизительно через 7 суток среду для культивирования заменяли на среду E (без аминоптерина).

Через период от 10 до 12 суток отдельные лунки подвергали скринингу на присутствие антител IgG мыши/легкие цепи каппа мыши с использованием гомогенного анализа HTRF. В этом анализе супернатанты из 96-луночных планшетов

для слияния смешивали с самостоятельно мечеными кривым тербия антителами козы к IgG мыши (специфичными к Fc γ) (Cisbio US Inc. Bedford, MA) и антителами козы к IgG мыши с мечеными AlexaFluor 647 (Jackson ImmunoResearch; каталожн. № 109-605-098) Fab'2. Инкубацию проводили в течение 1 часа. Затем планшеты считывали на сканере Rubystar. Затем гибридные клетки из лунок, положительных на антитела IgG мыши/легкие цепи каппа мыши подвергали скринингу посредством FACS с использованием клеток CHO, трансфицированных CD40 человека, и нетрансфицированных клеток CHO в качестве контроля (слияния 3582/ 3583), или посредством ELISA с использованием рекомбинантного белка с последующим FACS на В-клетках Daudi и Т-клетках Jurkat в качестве отрицательного контроля (слияния 3716/3717). Положительные в FACS исходные линии переносили в 24-луночные планшеты. Через несколько суток, супернатанты клеток из отдельных лунок повторно подвергали скринингу посредством FACS для подтверждения специфичности IgG к CD40 человека.

Панель антигенспецифичных гибридом клонировали посредством серийных разведений и повторно подвергали скринингу посредством FACS с использованием трансфектантов CHO или клеток Daudi. Выделяли девятнадцать антител после слияний 3582/3583 и двенадцать антител после слияний 3716/3717 и тестировали на функциональную активность. Из этой панели антител выбирали пять сильных агонистов для повторного субклонирования. Эти пять антител, а именно 1802,3582,19G3.F10.E1, 1802,3583,5G7.F12.G3, 1802,3583,8E8.C10.G2, 1802,3716,12D6.B1.E3 и 1802,3717,5F11.A11.E7 секвенировали и дополнительно анализировали.

ПРИМЕР 2

Получение полностью человеческих антител к huCD40

В способах по настоящему изобретению могут находить применение полностью человеческие моноклональные антитела к huCD40, которые связываются с тем же эпитопом и/или перекрестно блокируют связывание гуманизированных антител к CD40, описываемых в настоящем документе. Такие антитела можно получать с использованием трансгенных мышей, которые экспрессируют гены антител человека, как указано ниже.

Антиген

В качестве антигена для иммунизации используют растворимый рекомбинантный белок huCD40. Растворимый слитый белок состоит из внеклеточной части huCD40, связанной на своем С-конце с Fc IgG2a мыши. Этот слитый белок обозначают в настоящем документе как "слитый белок huCD40-muFc". Слитый белок получают стандартными способами рекомбинантных ДНК и экспрессируют в трансфицированных клетках CHO, которые секретируют растворимый слитый белок в супернатант культуры. Клетки-хозяева CHO, используемые для трансфекции, получают в Invitrogen (каталожн. № 11619-012). Секретируемый растворимый слитый белок выделяют для применения в качестве иммуногена. Последовательность полноразмерного CD40 человека, включая сигнальную последовательность, приведена в SEQ ID NO:1.

Трансгенные мыши

Полностью человеческие моноклональные антитела к CD40 человека получают с использованием мышей с генотипом CMD⁺⁺;JKD⁺⁺;KCo5(9272)⁺;SC20⁺ (далее в настоящем документе обозначаемых как мыши KM®). Обозначения отдельных трансгенов приведены в круглых скобках с последующими номерами линий для случайно интегрированных трансгенов. Символы ++ и + указывают гомозигот или гемизигот; однако так как у мышей скрининг, как правило, проводили с использованием анализа на основе ПЦР, это не позволяло авторам отличить гетерозиготность и гомозиготность для случайным образом интегрированных трансгенов Ig человека, обозначение + можно присваивать мышам, которые фактически гомозиготны по этим элементам. В этой линии эндогенный ген легкой цепи каппа мыши гомозиготно разрушен, как описано в Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820, а эндогенный ген тяжелой цепи мыши гомозиготно разрушен, как описано в примере 1 WO 2001/09187. Кроме того, эта линия мышей несет трансген легкой цепи каппа человека, KCo5, как описано в Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, искусственную дрожжевую хромосому (YAC), несущую большинство локуса легкой цепи каппа человека, как описано в WO 2000/026373.

Иммунизация мышей

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к CD40 человека, мышей KM® иммунизируют выделенным слитым белком huCD40-muFc. Общие схемы иммунизации описаны в Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 и WO 98/24884. При первой инфузии антигена возраст мышей составляет приблизительно 4 месяца. Для

интраперитонеальной или подкожной иммунизации мышей используют препарат выделенного рекомбинантного антигена huCD40-muFc (10 мкг, выделенные из трансфицированных клеток млекопитающих, экспрессирующих слитый белок) или клетки 300-19, трансфицированные CD40 человека. Иммуногены смешивают 1:1 с адьювантом RIBI (Sigma, каталожный № M6536).

Мышей иммунизируют пять раз с интервалами 5-7 суток. Первую и вторую иммунизации проводят с рекомбинантным белком. Третью иммунизацию проводят с клетками, четвертую иммунизацию с белком и пятую иммунизацию с клетками. Через неделю после последней иммунизации у мышей получают кровь для анализа титров антигенспецифичных антител. Иммунный ответ контролируют посредством ретроорбитальных заборов крови. Плазму подвергают скринингу посредством анализа FACS с использованием трансфицированных клеток 300-19, и для слияния используют мышей с наибольшими титрами IgG человека к CD40 человека. Мышам проводили конечную бустерную инъекцию посредством внутривенной (в/в) и интраперитонеальной (и/п) инъекции растворимого антигена за двое суток и трансфицированными клетками за трое суток до умерщвления и выделения селезенки.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела человека к CD40 человека

Спленоциты мыши, выделенные у мышей KM® с высоким титром и партнер по слиянию миелому мыши сливают с использованием электрослияния на основе электрического поля с использованием электропоратора с большой камерой для слияния клеток Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Суспензии одиночных клеток лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей сливают с равным количеством несекретирующих миеломных клеток мышей P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) (номер слияния: 2541). Полученные клетки высевают при $2,0 \times 10^4$ клеток/лунку в плоскодонные планшеты для микротитрования в селективную среду DMEM, содержащую высокую концентрацию глюкозы (Cellgro, № 10-013-CM) и 10% эмбриональную телячью сыворотку (Hyclone, № SH30071.03) и дополненную бета-меркаптоэтанолом (1000×, Gibco, № 21985-023), 7 mM HEPES (Cellgro 25-060-CI), дополнительно 2 mM L-глутамин (Cellgro 25-005-CI), HAT (50×, Sigma, № H-0262), 5% фактор клонирования гибридом (BioVeris, № 210001), 10% кондиционированную среду P388DI (ATCC, № CRL TIB-63) и пенициллин-стрептомицин (100×, Cellgro, № 30-002-CI). Приблизительно через 7 суток часть среды, содержащую HAT заменяют средой, содержащей HT (Cellgro, № 25-047-CI).

Через период от 10 до 12 суток отдельные лунки подвергают скринингу на присутствие антител IgG человека/легкая цепь каппа человека с использованием гомогенного анализа HTRF. В этом анализе супернатанты из 96-луночных планшето для слияния смешивали с мечеными криптоатом европия антителами козы к IgG человека (специфичными к фрагменту Fc), биотинилированными антителами козы к легкой цепи каппа человека (Bethyl, № A80-115B), стрептавидин-XLent и инкубируют в течение 1 часа. Затем планшеты считывают на сканере RUBYstar.

Затем гибридомные клетки из лунок, положительных по антителам IgG человека/легкая цепь каппа человека или IgG человека/легкая цепь лямбда человека, подвергают скринингу посредством FACS с использованием клеток 300-19, трансфицированных CD40 человека и нетрансфицированных клеток 300-19 в качестве контроля. Положительные в FACS исходные линии переносят в 24-луночные планшеты. Через несколько суток, супернатанты клеток из отдельных лунок повторно подвергали скринингу посредством FACS для подтверждения специфичности IgG к CD40 человека.

Гибридомы клонируют посредством серийного разведения и подвергают повторному скринингу посредством FACS.

ПРИМЕР 3

Гуманизирование антител к huCD40

Исходные антитела (мыши) по настоящему изобретению гуманизировали для потенциального применения в качестве терапевтических средств для человека. Для каждого вариабельного домена мыши выбирали наиболее близко соответствующую последовательность области зародышевой линии человека и эти каркасные области человека использовали для замены каркасов мыши в версиях антител "с привитыми CDR". Затем по мере необходимости проводили дополнительные замены аминокислот, такие как обратные мутации каркаса, для восстановления аффинности связывания гуманизированного антитела. Также проводили замены аминокислот для устранения подвижностей последовательности. Соответствие последовательностей различных форм антител по настоящему изобретению представлено в таблице 6. Связывание различных агонистических антител к huCD40 с растворимым CD40 человека определяли посредством анализа интерферометрии биослоев (BLI) с использованием устройства анализа взаимодействий без меток Fortebio Octet RED (Rapid system - Extended Detection). Все исследования проводили в 10 mM Na_xPO₄, 130 mM NaCl, 0,05%

поверхностно-активном веществе P20 (pH 7,1) при 25°C. В кратком изложении, супернатанты с антителами к huCD40 (разбавленные до 10 мкг/мл или захватываемые неразбавленными, если концентрация супернатанта составляла менее 10 мкг/мл) захватывали на покрытых белком А биосенсорах (Pall Fortebio, № 18-5010) с использованием времени загрузки 90 сек и скорости перемешивания 1000 об./мин. Сначала супернатанты подвергали скринингу на связывание с 1 мкМ мономером рекомбинантного CD40 человека (мономер huCD40) с использованием времени ассоциации и диссоциации 180 сек, при 1000 об./мин., с двумя этапами кондиционирования 15 сек с использованием между циклами связывания 10 мМ глицина pH 1,5. Затем все супернатанты, которые демонстрировали сигнал связывания в эксперименте с 1 мкМ мономером huCD40, тестировали на связывание с семью различными концентрациями мономера huCD40 в сериях трехкратных разведений, где наибольшая концентрация составляла 10 мкМ мономера huCD40 или 1 мкМ мономера huCD40 в зависимости от силы сигнала связывания в эксперименте скрининга с 1 мкМ. Результаты для отобранных антител и вариантов их последовательностей приведены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6

Аффинность связывания антител к CD40

Антитело	Тип	V _H	V _L	K _D (нМ)
12D6	Исходное	мышь	мышь	3,6
12D6-03	гуманизированное	Привитые CDR VH1-18	Привитые CDR VKII O11	4,8
12D6-22	гуманизированное	Привитые CDR VH1-18	VKII O11 <u>G29A</u>	3,6
12D6-23	гуманизированное	<u>M100bL</u> VH1-18	Привитые CDR VKII O11	4,3
12D6-24	гуманизированное	<u>M100bL</u> VH1-18	VKII O11 <u>G29A</u>	5,6
5F11	исходное	мышь	мышь	4,7
5F11-03	гуманизированное	Привитые CDR VH1-e	Привитые	>5000

			CDR VKIV B3	
5F11-17	гуманизированное	VH1-e G27Y S30T V37I R38K A40R M48I R66K V67T I69L	Привитые CDR VKIV B3	8,4
5F11-23	гуманизированное	VH1-e G27Y S30T V37I R38K A40R M48I R66K V67T I69L	VKIV B3 M4L N22S	4,9
5F11-45	гуманизированное	VH1-e G27Y S30T R66K V67T I69L	VKIV B3 M4L	12,3*
19G3	исходное	мышь	мышь	870
19G3-03	гуманизированное	Привитые CDR VH3-21	Привитые CDR VKII O11	отсутствие связывания
19G3-11	гуманизированное	VH3-21 S94R	Привитые CDR VKII O11	850
19G3-22	гуманизированное	VH3-21 S94R	VKII O11 <u>N28Q</u>	99
19G3-23	гуманизированное	VH3-21 S94R	VKII O11 <u>G29A</u>	1300
5G7	исходное	мышь	мышь	89
5G7-03	гуманизированное	Привитые CDR VH1-18	Привитые CDR VKI A20	340
5G7-22	гуманизированное	VH1-18 <u>M69L</u> A93V	Привитые CDR VKI A20	50
5G7-25	гуманизированное	VH1-18 <u>M69L</u> T71V A93V <u>G55A</u>	Привитые CDR VKI A20	69
5G7-28	гуманизированное	VH1-18 <u>M69L</u> T71V A93V <u>G55A M96L</u>	Привитые CDR VKI A20	230
8E8	исходное	мышь	мышь	85
8E8-05	гуманизированное	Привитые CDR VH1-e	Привитые CDR VKII A19	отсутствие связывания

8E8-56	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L	Привитые CDR VKII A19	82
8E8-62	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L <u>D99E</u>	Привитые CDR VKII A19	31
8E8-66	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L	VKII A19 <u>G29A</u>	82
8E8-67	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L <u>D99E</u>	VKII A19 <u>G29A</u>	28
8E8-70	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L <u>D99E G55S</u>	Привитые CDR VKII A19	низкий сигнал
8E8-71	гуманизированное	VH1-e L4F G27Y S30T R66K V67A T68L I69L <u>D99E G55S</u>	VKII A19 <u>G29A</u>	низкий сигнал

* = в целях сравнения, исходное 5F11 при проведении того же анализа параллельно с антителом 5F11-45 демонстрировало K_D 8,2 нМ (а не 4,7 нМ).

Для гуманизированных антител в столбцах V_H и V_L приведены зародышевые линии переменных доменов человека, на которых основаны каркасные области. "Привитые CDR" относится к переменным доменам, содержащим немодифицированные исходные CDR (мыши), привитые непосредственно на указанные каркасные последовательности человека. Нумерация остатков для всех вариантов последовательностей в таблице 6 приведена по Kabat, и, таким образом, положения изменений последовательностей в таблице 6 не соответствуют нумерации остатков последовательностей антител в списке последовательностей. Подчеркивание используют для указания модификаций последовательностей, которые предназначены для коррекции потенциальных подвижностей последовательностей, например, остатков, которые подвергаются химической модификации и потенциальному разрушению, приводя к гетерогенности продукта. Другие модификации последовательностей предназначены для восстановления аффинности, как правило,

обратные мутации каркаса (восстановление из зародышевой линии каркасной последовательности человека к исходному каркасному остатку мыши). Модификация M69L в тяжелой цепи антитела 5G7 представляет собой обратную мутацию каркаса и коррекцию подвижности.

ПРИМЕР 4

Эксперименты по сортировке эпитопов антител к CD40

Для определения того, какие антитела к CD40 человека конкурируют друг с другом за связывание с huCD40 и, таким образом, связываются со сходными эпитопами можно проводить эксперименты по сортировке эпитопов. Попарную конкуренцию между антителами к huCD40 определяют как указано ниже, где контрольное антитело связано с поверхностью сенсорного чипа, тестируемое антитело предварительно инкубируют с конструкцией полипептида huCD40 в смеси и предварительно инкубированную смесь пропускают над сенсорным чипом с определением степени, с которой тестируемое антитело препятствует связыванию конструкции полипептида huCD40 с контрольным антителом на поверхности чипа. Такие эксперименты по конкурированию можно проводить с использованием устройства SPR BIACORE®. В кратком изложении, контрольное антитело к huCD40 иммобилизуют на поверхности сенсорного чипа CM5 (Series S, GE Healthcare, каталожн. № BR-1005-30), в качестве отрицательного контроля используют flowcell2, flowcell3 и flowcell4 (5000 PE) и flowcell1. Тестируемое антитело разбавляют до 120 мкг/мл (2×) в начальной концентрации. Проводят ряд разведений тестируемого антитела проводя разведение концентрации антитела буфером 1:3 для семи различных концентраций и контрольного образца (с 0 мкг/мл) с получением кривой титрования. Каждую серию концентраций антител делят на две половины. В первой половине серии концентраций, добавляют 40 нМ (2×) антиген CD40 человека (например, huCD40/Fc) с получением конечной серии концентраций (60 мкг/мл - 0,0 мкг/мл) и 20 нМ конечной концентрации антигена в каждой лунке. Во второй половине серии концентраций вместо антигена добавляют буфер так, чтобы получить антитело, разбавленное до той же концентрации, и эту половину обрабатывают в качестве контроля. Комплексы тестируемых антител к CD40 и huCD40/Fc инкубируют в течение 2 часов. 40 мкл комплексов инъецируют на покрытую контрольным антителом поверхность при 30 мкл/мин. Используют устройство поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® T200, а подвижный буфер представляет собой HBE-EP, GE Healthcare, каталожн. № BR-1001-88,

фильтрованный, дегазированный, 0,01M HEPES, pH7,4, 0,15 NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% поверхностно-активного вещества P20. Поверхность регенерируют 25 mM NaOH (код заказа: BR-1003-58, GE Healthcare) при 100 мкл/мин в течение 5 секунд. Данные анализируют с использованием Microsoft Excel, где концентрацию тестируемых антитела наносят на график в зависимости от соответствующих единиц ответа с получением кривых титрования.

Результаты таких эксперименты по сортировке эпитопов антител к CD40 по настоящему изобретению предоставлены на фиг. 2. Антитела 5F11 и 8E8 блокируют связывание лиганда (CD40L). Пять антител к CD40 по настоящему изобретению попадают в три группы эпитопов - 12D6/5G7/19G3, 5F11/5G7/19G3 и 8E8.

ПРИМЕР 5

Картирование эпитопов посредством HDX

Эпитопы антител к huCD40 12D6, 5G7, 19G3 и 5F11 по настоящему изобретению определяли посредством масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Посредством HDX-MS зондирует конформацию белка и конформационную динамику в растворе, проводя мониторинг скорости и степени обмена атомов водорода амидов каркаса на дейтерий. Huang & Chen (2014) Anal. Bioanalytical Chem. 406:6541; Wei et al. (2014) Drug Disc. Today 19:95. Уровень HDX зависит от доступности атомов водорода амидов каркаса и водородных связей белков для растворителя. Увеличение массы белка при HDX можно точно определять посредством MS. Когда этот способ сопрягают с ферментативным расщеплением, можно разрешать структурные характеристики на пептидном уровне, позволяя различать экспонированные на поверхности пептиды от пептидов, уложенных внутри, или от пептидов, которые изолированы на поверхности контакта белок-белкового комплекса. Как правило, проводят мечение дейтерием и последующие эксперименты по гашению с последующим ферментативным расщеплением, разделением пептидов и анализом MS.

Перед экспериментами по картированию эпитопов проводили эксперименты без дейтерия с получением списка общих пептидов для мономера рекомбинантного CD40 человека (10 мкМ) и белковых комплексов CD40 с mAb 12D6, 5G7, 19G3 и 5F11 (молярное отношение 1:1). В эксперименте HDX-MS 5 мкл каждого образца (CD40 или CD40 с mAb 12D6, 5G7, 19G3 и 5F11, соответственно) разбавляли в 55 мкл буфера D₂O (10 mM фосфатный буфер, D₂O, pH7,0) для начала реакций мечения. Реакции

проводили в течение различных периодов времени: 20 сек, 1 мин, 10 мин и 240 мин. В конце каждого периода реакции меченая реакцию гасили, добавляя гасящий буфер (100 мМ фосфатный буфер с 4М GdnCl и 0,4М TCEP, pH 2,5, 1:1, об./об.) и 50 мкл гашеного образца инъецировали в систему Waters HDX-MS для анализа. Мониторинг уровня захвата дейтерия общих пептических пептидов проводили в отсутствие/присутствии mAb к CD40. Полученное покрытие последовательности составляло 82%.

Эпитопы HDX для mAb к CD40 12D6, 5G7, 19G3 и 5F11 приведены в таблице 7. Антитело 12D6 защищало два пептиды, один из которых (остатки 11-28) включал часть сигнальной последовательности и, таким образом, с низкой вероятностью является физиологически значимым сам по себе, но указывает на то, что 12D6 осуществляет контакты в области 21-28, чего не делают mAb 5G7 и 19G3.

ТАБЛИЦА 7

Эпитопы HDX

Clone	CD40 остатки (SEQ ID NO:1)	Последовательность
12D6	11-28	WGCLLTAVHPEPPTACRE
12D6	21-35	EPPTACREKQYLINS
5G7	21-35	EPPTACREKQYLINS
19G3	21-35	EPPTACREKQYLINS
5F11	58-66	ECLPCGESE

ПРИМЕР 6

Картирование эпитопов посредством дрожжевого дисплея

Эпитопы для отобранных химерных или гуманизированных антител к huCD40 по настоящему изобретению определяют посредством дисплея подвергнутых случайному мутагенезу вариантов внеклеточной области huCD40 на дрожжах и сортировки этих дрожжей на основе их неспособности связываться с конкретными антителами. Отобранные дрожжевые клетки, неспособные к связыванию, размножают и подвергают дополнительным этапам селекции на основе их неспособности к связыванию с конкретными химерными или гуманизированными формами антител по настоящему изобретению. См., например, Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342:539. Для полученных дрожжей определяют последовательности для вариантов huCD40 и анализируют на влияние каждого остатка на связывание антитела. Связывающиеся

эпитопы для антител по настоящему изобретению определяют как локусы в последовательности huCD40, где одиночные мутации аминокислот нарушают связывание с антителами к huCD40 по настоящему изобретению.

В кратком изложении, для клонирования кодирующей CD40 человека ДНК в конструкции используют ПЦР со сниженной точностью, обеспечивая экспрессию вариантов huCD40 в виде N-концевых частей слитых белков, дополнительно содержащих последовательность-метку с-тус и белок стенки дрожжевой клетки Aga1p. Такие конструкции при экспрессии в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*), экспонируют варианты полипептидов huCD40 на поверхности дрожжевых клеток, заякоренные на клеточной поверхности полипептидом Aga1p. Метку с-тус необязательно можно использовать в качестве положительного контроля экспонирования слитых белков huCD40 на данной дрожжевой клетки. Дрожжевые клетки сортируют посредством FACS, и клетки, которые экспрессируют правильно уложенные слитые белки huCD40 (как определяют по связыванию контрольного антитела мыши к huCD40, детектируемого посредством меченных аллофикоцианином (APC) вторичных антител козы к IgG мыши), но не связываются с антителами по настоящему изобретению (как определяют посредством детекции мечеными фикоэритрином (PE) антителами козы к IgG человека в качестве вторичных антител), объединяют, размножают и используют в последующих этапах отбора. Для конструкций из дрожжей, оставшихся после нескольких этапов отбора, определяют последовательность huCD40. Для подтверждения хорошего покрытия мутантами в каждом положении последовательности huCD40 проводят контрольные эксперименты без отбора с антителами к huCD40 и обеспечивают исходный уровень для нормализации результатов, полученных с отобранными библиотеками.

ПРИМЕР 7

Агонистическая активность антител к CD40

Влияние вариации последовательности Fc на агонистическую активность выбранных антител к CD40 по настоящему изобретению оценивали, определяя активацию незрелых дендритных клеток (DC). Эксперименты проводили с конструкциями mAb к CD40 12D6-24 с последовательностями IgG1f человека (контроль), Fc SE, SELF, P238D, V4, V8 и V12. У здоровых нормальных доноров выделяли моноциты человека (CD14⁺) с использованием адгезии к пластику или микрогранул с CD14 человека (Miltenyi Biotec). Моноциты культивировали со 100

нг/мл GM-CSF (Miltenyi Biotec) и 100 нг/мл IL-4 (Miltenyi Biotec). На сутки 2 и сутки 5 половину среды удаляли и восстанавливали. Незрелые дендритные клетки собирали на сутки 6-7. DC двух доноров инкубировали с указанными концентрациями антител в течение ночи при 37°C. Собирали супернатанты культур клеток и анализировали на продукцию IL-6 человека (Cisbio). См. фиг. 3А и 3В.

Контрольные антитела человека IgG1f не индуцировали секрецию IL-6 при использовании в концентрации до 100 нМ, а вариант P238D обеспечивал только слабую индукцию. В отличие от этого, все варианты SE, SELF, V9 и V12 значительно увеличивали секрецию IL-6, а V8 и V4 демонстрировали промежуточное действие. Эти результаты приблизительно коррелируют с аффинностью связывания к FcγRIIb и подтверждают, что использование правильных вариантов последовательностей Fc может приводить к получению антител к CD40 с увеличенной агонистической активностью.

Кроме того, различия в агонистической активности между антителами с переменными областями 8E8, 5G7, 12D6, 19G3 и 5F11 оценивали в экспериментах с использованием химерных конструкций mAb к CD40, содержащих общий константный домен V12 IgG1f человека. Определяли активацию у незрелых дендритных клеток *in vitro* (выделенных, как описано в предыдущем абзаце), высевая клетки в 96-луночный планшет, добавляя антитела, как указано, и инкубируя в течение ночи при 37°C. Затем клетки собирали и окрашивали флуоресцентным антителом к CD54, которое детектировали посредством активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS). См. фиг. 4.

Контрольное антитело человека IgG1f не вызывало значимого повышения уровня CD54, тогда как 12D6 вызывало значительное увеличение уровня CD54. Антитела 19G3 и 8G8 являлись в определенной степени менее эффективными, чем 12D6, а антитела 5G7 и 5F11 были сходны друг с другом и демонстрировали относительно низкую стимуляцию. Результаты активации не обязательно коррелируют с аффинностью связывания к CD40, так как антитело 5F11 обладает почти наибольшей аффинностью связывания и при этом является слабым агонистом, тогда как антитело 19G3 является противоположным. Вне зависимости от причин различия эти результаты подтверждают, что для получения антител к CD40 с увеличенной агонистической активностью важным является использование правильной последовательности антигенсвязывающего домена.

ПРИМЕР 8

Ликвидация изомеризации DG

Антитела по настоящему изобретению, содержащие варианты последовательности Fc V4 и V9, демонстрируют неприемлемые уровни изомеризации DG в положении D270. Такая изомеризация является нежелательной, так как она приводит к гетерогенности продукта и потенциально снижает эффективность. Для уменьшения такой изомеризации остаток аспарагиновой кислоты в положении 270 Fc V4 заменяют на глутаминовую кислоту (D270E), а положение 270 Fc V9 заменяют на аланин, глутаминовую кислоту, глутамин, серин и треонин (D270A, D270E, D270Q, D270S, D270T). Из клеток, экспрессирующих эти антитела, получали супернатанты и анализировали на связывание с hCD32/FcγRII. В качестве контроля использовали отобранные выделенные антитела без мутаций в положении 270. Эти эксперименты проводили на антителах с переменными доменами mAb 12D6-24 и 5F11-45. Результаты представлены на фиг. 5.

Для вариантов Fc V4 и V9 замена D270E приводила к незначительному снижению связывания рецептора. Другие протестированные варианты Fc V9 (D270A, D270Q, D270S, D270T) приводили к большему снижению связывания рецептора. Результаты не зависели от того, являлось ли антитело 12D6 или 5F11. Во всех случаях тестируемое относительное связывание (по рангам) с тремя рецепторами (FcγRIIa-H131, FcγRIIa-R131 и FcγRIIb) оставалось сходным приблизительно с эквивалентным связыванием с FcγRIIa-R131 и FcγRIIb и значительно более слабым связыванием с FcγRIIa-H131.

Для обоих вариантов V4 и V9, замена D270E сохраняла приемлемо высокую аффинность к FcγR и сохраняла специфичность к FcγRIIb, которая желательна для увеличения агонистической активности антител к CD40 по настоящему изобретению.

ТАБЛИЦА 8

Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID	Описание
1	CD40 человека (NP_001241)
2	CD40L-gr39 человека (NP_000065.1)
3	Химерная тяжелая цепь 12D6
4	Химерная легкая цепь 12D6
5	Тяжелая цепь 12D6-03
6	Легкая цепь 12D6-03
7	Тяжелая цепь 12D6-22
8	Тяжелая цепь 12D6-22 V9
9	Легкая цепь 12D6-22/12D6-24
10	Тяжелая цепь 12D6-23
11	Легкая цепь 12D6-23
12	Тяжелая цепь 12D6-24
13	Тяжелая цепь 12D6-24 P238D
14	Тяжелая цепь 12D6-24 SE
15	Тяжелая цепь 12D6-24 SELF
16	Тяжелая цепь 12D6-24 V4
17	Тяжелая цепь 12D6-24 V4 D270E
18	Тяжелая цепь 12D6-24 V8
19	Тяжелая цепь 12D6-24 V9
20	Тяжелая цепь 12D6-24 V9 D270E
21	Тяжелая цепь 12D6-24 V11
22	Тяжелая цепь 12D6-24 V12
23	Химерная тяжелая цепь 5F11
24	Химерная легкая цепь 5F11
25	Тяжелая цепь 5F11-17
26	Легкая цепь 5F11-17
27	Тяжелая цепь 5F11-23
28	Легкая цепь 5F11-23
29	Тяжелая цепь 5F11-45

30	Легкая цепь 5F11-45
31	Тяжелая цепь 5F11-45 SE
32	Тяжелая цепь 5F11-45 SELF
33	Тяжелая цепь 5F11-45 V4
34	Тяжелая цепь 5F11-45 D270E V4
35	Тяжелая цепь 5F11-45 V8
36	Тяжелая цепь 5F11-45 V9
37	Тяжелая цепь 5F11-45 V9 D270E
38	Тяжелая цепь 5F11-45 V11
39	Тяжелая цепь 5F11-45 V12
40	Химерная тяжелая цепь 8E8
41	Химерная легкая цепь 8E8
42	Тяжелая цепь 8E8-56
43	Легкая цепь 8E8-56
44	Тяжелая цепь 8E8-62
45	Легкая цепь 8E8-62
46	Тяжелая цепь 8E8-67
47	Легкая цепь 8E8-67
48	Тяжелая цепь 8E8-70
49	Легкая цепь 8E8-70
50	Тяжелая цепь 8E8-71
51	Легкая цепь 8E8-71
52	Химерная тяжелая цепь 5G7
53	Химерная легкая цепь 5G7
54	Тяжелая цепь 5G7-22
55	Легкая цепь 5G7-22
56	Тяжелая цепь 5G7-25
57	Легкая цепь 5G7-25
58	Химерная тяжелая цепь 19G3
59	Химерная легкая цепь 19G3
60	Тяжелая цепь 19G3-11
61	V9 19G3-11

62	Легкая цепь 19G3-11
63	Тяжелая цепь 19G3-22
64	Легкая цепь 19G3-22
65	Константный домен IgG1f человека
66	Константный домен SE
67	Константный домен SELF
68	Константный домен P238D
69	Константный домен V4
70	Константный домен V4 D270E
71	Константный домен V7
72	Константный домен V8
73	Константный домен V9
74	Константный домен V9 D270E
75	Константный домен V11
76	Константный домен V12
77	Константный домен легкой цепи каппа
78	Сигнальная последовательность

В списке последовательностей предоставлены последовательности зрелых тяжелых и легких цепей (т.е., последовательности не содержат сигнальных пептидов). Сигнальная последовательность для получения антител по настоящему изобретению, например, в клетках человека, приведена в SEQ ID NO:78.

Эквиваленты:

Специалистам в данной области очевидны, или они с использованием не более чем общепринятого экспериментирования могут определить множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления, описываем в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для включения посредством приводимой ниже формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> АНТИТЕЛА К CD40

<130> 12581-WO-РСТ

<150> 62/186076

<151> 2015-06-29

<150> 62/252615

<151> 2015-11-09

<160> 78

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> СИГНАЛЬНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<222> (1) .. (20)

<220>

<221> ПЕПТИД

<222> (21) .. (277)

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (21) .. (193)

<223> внеклеточный домен

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (194) .. (215)

<223> трансмембранный домен

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (216) .. (277)

<223> внутриклеточный домен

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 2

<211> 261

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly	1	5	10	15
Leu	Pro	Ile	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	20	25	30	
Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg	35	40	45	
Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val	50	55	60	
Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser	65	70	75	80
Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys	85	90	95	
Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu	100	105	110	
Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser	115	120	125	
Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly	130	135	140	
Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	145	150	155	160
Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr	165	170	175	
Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser	180	185	190	
Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	195	200	205	
Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His	210	215	220	
Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn	225	230	235	240
Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	245	250	255	

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 3
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химерное антитело с переменным доменом мыши, константным доменом человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 3

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 219
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(112)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(39)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(102)
<223> CDRL3

<400> 4

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

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

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Ile His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

<210> 5
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (119)
<223> вариабельный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) .. (35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(112)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(39)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(102)
<223> CDRL3

<400> 6

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Ile His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly 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

<210> 7
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> вариабельный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)

<223> CDRH3

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 219

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(112)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(39)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(102)
<223> CDRL3

<400> 9

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Ile His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly 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

<210> 10
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 219
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (112)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24) .. (39)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55) .. (61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94) .. (102)
<223> CDRL3

<400> 11

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Ile His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly 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

<210> 12

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	370	375	380
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	405	410	415
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	420	425	430

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

<210> 13

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(119)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(108)

<223> CDRH3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> вариабельный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)

<223> CDRH3

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDRH3

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245						250				255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260					265					270				
Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
385					390					395					400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				405					410					415			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				

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

<210> 17

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<211> 448
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (119)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) .. (35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50) .. (66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99) .. (108)
 <223> CDRH3

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130																	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		
				165					170					175			
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		
			180					185					190				
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		
		195					200					205					
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		
	210					215					220						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp		
225					230					235					240		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				245					250					255			
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Glu	Asp		
			260					265					270				
Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310				315						320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
		355					360					365					
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		

385 390 395 400

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

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

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

<210> 19

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(119)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(108)

<223> CDRH3

<400> 19

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

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

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

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

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

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

325

330

335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 448

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Ala	Arg	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Glu	260	265	270
Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 448
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) .. (35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50) .. (66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99) .. (108)
<223> CDRH3

<400> 21

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

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

Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Glu	Asp	260	265	270	
Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 448
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(119)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(108)

<223> CDRH3

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 446
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(117)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> CDRH3

<400> 23

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

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

Ser Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	210	215	220
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	325	330	335
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	340	345	350
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	355	360	365
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	370	375	380
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	385	390	395
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	405	410	415

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

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

<210> 24
<211> 218
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(111)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(38)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(60)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(101)
<223> CDRL3

<400> 24

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asn Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 446
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (117)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) .. (35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50) .. (66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99) .. (106)
<223> CDRH3

<400> 25

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

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

Ser Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 218

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(111)

<223> вариабельный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24) .. (38)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54) .. (60)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93) .. (101)
<223> CDRL3

<400> 26

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 446
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(117)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(106)
<223> CDRH3

<400> 27

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

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

Ser Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala	Arg	Leu	Ile	Leu	Gln	Arg	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205	
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	210	215	220	
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235	240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315	320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	325	330	335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	340	345	350	

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 218
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (111)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24) .. (38)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54) .. (60)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93) .. (101)
<223> CDRL3

<400> 28

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(117)

<223> вариабельный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(106)
<223> CDRH3

<400> 29

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30
 <211> 218
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (111)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24) .. (38)
 <223> CDRL1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (54) .. (60)
 <223> CDRL2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93) .. (101)
 <223> CDRL3

<400> 30

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31
<211> 446
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1) .. (117)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31) .. (35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50) .. (66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99) .. (106)
<223> CDRH3

<400> 31

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

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

Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Ile	Leu	Gln	Arg	Gly	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
		115					120					125			
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
	130					135					140				
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165					170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
		195					200					205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
	210					215					220				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 446
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(117)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(35)
<223> CDRH1

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> CDRH3

<400> 32

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(117)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> CDRH3

<400> 33

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	180	185	190
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	195	200	205
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	210	215	220
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	225	230	235
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Gly	Glu	260	265	270
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	325	330	335
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	340	345	350
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	355	360	365
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	370	375	380
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	385	390	395
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	405	410	415

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

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

<210> 34

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<400> 34

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Asp Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<400> 35

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
		195				200						205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
		210				215				220					
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Val
		225				230				235				240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245				250						255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Glu	Asp	Gly	Glu
		260						265				270			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275				280						285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
		290				295				300					
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
		305				310				315				320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325				330						335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
		340						345				350			
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355				360				365					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
		370				375				380					
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
		385				390				395				400	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405				410						415	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		420						425				430			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435				440						445			

<210> 36
 <211> 446
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (117)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) .. (35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50) .. (66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99) .. (106)
 <223> CDRH3

<400> 36

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ala 130	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 135	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala 140	Ala	Leu	Gly	Cys
Leu 145	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 150	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 155	Val	Ser	Trp	Asn	Ser 160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 165	Gly	Val	His	Thr	Phe 170	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser 175
Ser	Gly	Leu	Tyr 180	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 185	Val	Thr	Val	Pro	Ser 190	Ser	Ser
Leu	Gly	Thr 195	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys 200	Asn	Val	Asn	His	Lys 205	Pro	Ser	Asn
Thr 210	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val 215	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys 220	Asp	Lys	Thr	His
Thr 225	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 230	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 235	Gly	Asp	Asp	Ser	Val 240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 245	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 250	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr 255
Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	His	Glu	Asp 270	Gly	Glu
Val	Lys	Phe 275	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 280	Gly	Val	Glu	Val	His 285	Asn	Ala	Lys
Thr 290	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 295	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 300	Arg	Val	Val	Ser
Val 305	Leu	Thr	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 315	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn 325	Lys	Ala	Leu	Pro	Arg 330	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr 335	Ile
Ser	Lys	Ala	Lys 340	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 345	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 350	Leu	Pro
Pro	Ser	Arg 355	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 360	Asn	Gln	Val	Ser	Leu 365	Thr	Cys	Leu
Val	Lys 370	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 375	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 380	Trp	Glu	Ser	Asn

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

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

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

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

<210> 37

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<400> 37

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145						150						155				160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
				165					170					175		
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	
			180					185					190			
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	
		195					200					205				
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	
	210					215					220					
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Asp	Asp	Ser	Val	
225					230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
				245					250					255		
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Glu	Gly	Glu	
			260					265					270			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
		275					280					285				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
	290					295					300					
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
305					310					315					320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				325					330					335		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
			340					345					350			
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
		355					360					365				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
	370					375					380					
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
385					390					395					400	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	

405

410

415

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

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

<210> 38

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(117)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> CDRH3

<400> 38

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

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

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu
 260 265 270

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

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

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

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

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

340

345

350

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

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 446

<212> Блок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(117)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(106)

<223> CDRH3

<400> 39

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Leu

20

25

30

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

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

Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275

280

285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 40

<211> 451

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1) .. (122)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31) .. (35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(111)
<223> CDRH3

<400> 40

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ile Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Asp Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

210		215		220
Cys 225	Asp	Lys	Thr	His
				Thr 230
				Cys
				Pro
				Pro
				Cys
				Pro 235
				Ala
				Pro
				Glu
				Leu
				Leu 240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245
				Phe
				Leu
				Phe
				Pro
				Pro
				Lys
				Pro
				Lys
				Asp
				Thr
				Leu 255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				260
				Pro
				Glu
				Val
				Thr
				265
				Cys
				Val
				Val
				Val
				Asp
				Val
				Ser
His	Glu	Asp	Pro	Glu
				275
				Val
				Lys
				Phe
				280
				Asn
				Trp
				Tyr
				Val
				Asp
				Gly
				Val
				Glu
Val	His	Asn	Ala	Lys
				290
				Thr
				Lys
				295
				Pro
				Arg
				Glu
				Glu
				Gln
				300
				Tyr
				Asn
				Ser
				Thr
Tyr	Arg	Val	Val	Ser
305				310
				Val
				Leu
				Thr
				Val
				Leu
				His
				315
				Gln
				Asp
				Trp
				Leu
				Asn
				320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				325
				Cys
				Lys
				Val
				Ser
				Asn
				330
				Lys
				Ala
				Leu
				Pro
				Ala
				335
				Pro
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				340
				Ser
				Lys
				Ala
				Lys
				345
				Gly
				Gln
				Pro
				Arg
				Glu
				Pro
				Gln
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				355
				Pro
				Ser
				Arg
				360
				Glu
				Glu
				Met
				Thr
				Lys
				365
				Asn
				Gln
				Val
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
370				375
				Val
				Lys
				Gly
				Phe
				Tyr
				Pro
				380
				Ser
				Asp
				Ile
				Ala
				Val
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
385				390
				Gly
				Gln
				Pro
				Glu
				Asn
				395
				Asn
				Tyr
				Lys
				Thr
				Thr
				Pro
				400
Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				405
				Asp
				Gly
				Ser
				Phe
				Phe
				410
				Leu
				Tyr
				Ser
				Lys
				Leu
				415
Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				420
				Trp
				Gln
				Gln
				Gly
				425
				Asn
				Val
				Phe
				Ser
				430
				Cys
				Ser
				Val
Met	His	Glu	Ala	Leu
				435
				His
				Asn
				440
				His
				Tyr
				Thr
				Gln
				Lys
				445
				Ser
				Leu
				Ser
				Leu
Ser	Pro	Gly		
				450

<211> 219
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1) .. (112)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (39)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55) .. (61)

<223> CDRL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (94) .. (102)

<223> CDRL3

<400> 41

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

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

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

<210> 42
 <211> 451
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(122)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(111)
 <223> CDRH3

<400> 42

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

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

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Asp Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly
 450

<210> 43
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
 областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (112)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24) .. (39)
 <223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(102)
<223> CDRL3

<400> 43

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 44
 <211> 451
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(122)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(111)

<223> CDRH3

<400> 44

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Glu Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

	115					120					125				
Ser	Val 130	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 135	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 140	Ser	Gly	Gly	Thr
Ala 145	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu 150	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 155	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser 165	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 170	Gly	Val	His	Thr	Phe 175	Pro
Ala	Val	Leu	Gln 180	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 185	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 190	Val	Thr
Val	Pro	Ser 195	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 200	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys 205	Asn	Val	Asn
His	Lys 210	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 215	Val	Asp	Lys	Arg	Val 220	Glu	Pro	Lys	Ser
Cys 225	Asp	Lys	Thr	His	Thr 230	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 235	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val 245	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 250	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 255	Leu
Met	Ile	Ser	Arg 260	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 265	Cys	Val	Val	Val	Asp 270	Val	Ser
His	Glu	Asp 275	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 280	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 285	Gly	Val	Glu
Val	His 290	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 295	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 300	Tyr	Asn	Ser	Thr
Tyr 305	Arg	Val	Val	Ser	Val 310	Leu	Thr	Val	Leu	His 315	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 325	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 330	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Pro
Ile	Glu	Lys	Thr 340	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 345	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 350	Pro	Gln
Val	Tyr	Thr 355	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 360	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 365	Asn	Gln	Val
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val

370

375

380

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

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

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

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

Ser Pro Gly
 450

<210> 45
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(112)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(39)
 <223> CDRL1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(61)
 <223> CDRL2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(102)
 <223> CDRL3

<400> 45

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 46

<211> 451

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(122)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(111)

<223> CDRH3

<400> 46

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Glu Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly

<210> 47
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(112)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(39)
 <223> CDRL1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(61)
 <223> CDRL2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94)..(102)
 <223> CDRL3

<400> 47

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 48

<211> 451

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(122)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(111)

<223> CDRH3

<400> 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Glu Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275

280

285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly
 450

<210> 49

<211> 219

<212> Блок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизованное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(112)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(39)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(61)

<223> CDRL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (94)..(102)

<223> CDRL3

<400> 49

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 50

<211> 451

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
 областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(122)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(111)

<223> CDRH3

<400> 50

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Leu Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ser Leu Tyr Glu Gly Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

100					105					110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245						250				255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275					280					285			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290					295					300				
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val

355

360

365

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

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

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

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

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

Ser Pro Gly
 450

<210> 51
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (112)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24) .. (39)
 <223> CDRL1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55) .. (61)
 <223> CDRL2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94) .. (102)
 <223> CDRL3

<400> 51

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg

20

25

30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 52

<211> 442

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерное антитело с вариабельным доменом мыши и константным доменом человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(113)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31) .. (35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50) .. (66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99) .. (102)

<223> CDRH3

<400> 52

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

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

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Val Arg Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln

180	185	190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 195 200 205		
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 210 215 220		
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 225 230 235 240		
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 245 250 255		
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 260 265 270		
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 275 280 285		
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 290 295 300		
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 305 310 315 320		
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 325 330 335		
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu 340 345 350		
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 355 360 365		
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 370 375 380		
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 385 390 395 400		
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly 405 410 415		
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 420 425 430		
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

<210> 53
 <211> 214
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(107)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(34)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(56)

<223> CDRL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDRL3

<400> 53

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 54
 <211> 442
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(113)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(102)
 <223> CDRH3

<400> 54

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Val Arg Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

275

280

285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 55

<211> 214

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
 областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1) .. (107)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (34)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(56)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(97)
<223> CDRL3

<400> 55

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

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

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

Tyr Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 56
 <211> 442
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(113)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(102)
 <223> CDRH3

<400> 56

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

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Ala Gly Thr Ile Tyr Asn Leu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Val Arg Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser

115						120						125			
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
130						135					140				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180					185					190		
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195					200					205			
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225					230					235					240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
			260					265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		275					280					285			
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	290					295					300				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305					310					315					320
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
			340					345					350		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu

370

375

380

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

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

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

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

<210> 57

<211> 214

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1) .. (107)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (34)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50) .. (56)

<223> CDRL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89) .. (97)

<223> CDRL3

<400> 57

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 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 58
 <211> 441
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (112)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) .. (35)
 <223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDRH2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(101)
<223> CDRH3

<400> 58

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

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

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

Ala Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

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

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

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

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

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

<210> 59
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химерное антитело с переменным доменом мыши и константным доменом человека

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(112)
<223> переменный домен

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(39)
<223> CDRL1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(61)
<223> CDRL2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(102)
<223> CDRL3

<400> 59

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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

<210> 60

<211> 441

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(112)

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(101)

<223> CDRH3

<400> 60

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

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

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

Ser Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50

55

60

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

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

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

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

305 310 315 320
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 61
 <211> 441
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (112)
 <223> переменный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31) .. (35)
 <223> CDRH1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50) .. (66)
 <223> CDRH2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99) .. (101)
 <223> CDRH3

<400> 61

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

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

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

Ser Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

<223> вариабельный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (39)

<223> CDRL1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55) .. (61)

<223> CDRL2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (94) .. (102)

<223> CDRL3

<400> 62

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 63

<211> 441

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными
 областями человека

<220>

<221> ДОМЕН

<222> (1)..(112)

<223> переменный домен

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDRH1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(66)

<223> CDRH2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(101)

<223> CDRH3

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Ser Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

340

345

350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 64
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> гуманизированное антитело с CDR мыши и каркасными и константными областями человека

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1) .. (112)
 <223> вариабельный домен

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24) .. (39)
 <223> CDRL1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55) .. (61)
 <223> CDRL2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (94) .. (102)
 <223> CDRL3

<400> 64

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20

25

30

Gln Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly 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

<210> 65

<211> 329

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235	240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 66

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 67

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235	240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300	

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 68

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 69

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 69

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr		
65					70					75					80		
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85						90					95			
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
			100					105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
		115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
	130					135					140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
145					150					155					160		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
				165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
			180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
		195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu		
225					230					235					240		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
				245					250					255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
			260					265					270				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
		275					280					285					
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
	290					295					300						
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr		
305					310					315					320		

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 70

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 70

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Glu Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 71

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 71

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90					95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				115					120					125		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				130					135					140		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Gly	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
				145					150					155		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				195					200					205		
Lys	Ala	Leu	Pro	Arg	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
				210					215					220		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
				225					230					235		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
				275					280					285		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
				290					295					300		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
				305					310					315		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								
				325												

<210> 72
 <211> 329
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> вариант константного домена IgG1f человека

 <400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 73

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 73

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 74
<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 74

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Glu Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 75

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 75

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 76

<211> 329

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант константного домена IgG1f человека

<400> 76

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 77
<211> 107
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 78
<211> 17
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 78

Met	Arg	Ala	Trp	Ile	Phe	Phe	Leu	Leu	Cys	Leu	Ala	Gly	Arg	Ala	Leu
1				5					10					15	

Ala

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD40 человека и конкурируют за связывание с CD40 человека в анализе перекрестного блокирования с одним или несколькими из антител, выбранных из группы, состоящей из 12D6 (SEQ ID NO: 3 и 4), 5F11 (SEQ ID NO: 23 и 24), 8E8 (SEQ ID NO: 40 и 41), 5G7 (SEQ ID NO: 52 и 53) и 19G3 (SEQ ID NO: 58 и 59).

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п. 1, где конкуренция в анализе перекрестного блокирования включает способность уменьшать связывание выбранного антитела с CD40 человека в конкурентном ELISA по меньшей мере на 20% при использовании в равных молярных концентрациях с выбранным антителом.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD40 человека в:

а. эпитопе, содержащем или состоящем из последовательности EPPTACREKQYLINS (остатки 21-35 SEQ ID NO:1) (антитела 12D6, 5G7 и 19G3); или

б. эпитопе, содержащем или состоящем из последовательности ECLPCGESE (остатки 58-66 SEQ ID NO:1) (антитело 5F11).

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD40 человека, содержащие:

а) последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-39_01 и зародышевой линии J-области IGHI4 и

последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-110_01 и зародышевой линии J-области IGKJ1 (12D6);

б) последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-4_02 и зародышевой линии J-области IGHI3 и

последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK3-5_01 и зародышевой линии J-области IGKJ5 (5F11);

с) последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-80_01 и зародышевой линии J-области IGHJ2 и

последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-110_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2 (8E8);

d) последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH1-18_01 и зародышевой линии J-области IGHJ4 и

последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK10-96_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2 (5G7); или

e) последовательности CDR тяжелой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VH5-9-4_01 и зародышевой линии J-области IGHJ3 и

последовательности CDR легкой цепи, происходящие, по меньшей мере частично, из зародышевой линии V-области мыши VK1-117_01 и зародышевой линии J-области IGKJ2 (19G3).

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п. 1, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь содержит последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и легкая цепь содержит последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, выбранные из группы, состоящей из:

a) CDR антитела 12D6-03, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:5, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:6;

b) CDR антитела 12D6-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:7, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:9;

c) CDR антитела 12D6-23, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:10, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:11;

d) CDR антитела 12D6-24, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-108, соответственно, SEQ ID NO:12, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:9;

е) CDR антитела 5F11-17, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:25, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:26;

ф) CDR антитела 5F11-23, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:27, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:28;

г) CDR антитела 5F11-45, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-106, соответственно, SEQ ID NO:29, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-38, 54-60 и 93-101, соответственно, SEQ ID NO:30;

h) CDR антитела 8E8-56, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:42, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:43;

и) CDR антитела 8E8-62, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:44, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:45;

ж) CDR антитела 8E8-67, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:46, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:47;

к) CDR антитела 8E8-70, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:48, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:49;

л) CDR антитела 8E8-71, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-111, соответственно, SEQ ID NO:50, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:51;

м) CDR антитела 5G7-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-102, соответственно, SEQ ID NO:54, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-34, 50-56 и 89-97, соответственно, SEQ ID NO:55;

н) CDR антитела 5G7-25, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-102, соответственно, SEQ ID NO:56, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-34, 50-56 и 89-97, соответственно, SEQ ID NO:57;

о) CDR антитела 19G3-11, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-101, соответственно, SEQ ID NO:60, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:62; и

р) CDR антитела 19G3-22, где CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат остатки 31-35, 50-66 и 99-101, соответственно, SEQ ID NO:63, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат остатки 24-39, 55-61 и 94-102, соответственно, SEQ ID NO:64.

6. Антитело по п. 5, содержащее последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из:

а) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 12D6-03, содержащих остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

б) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 12D6-22, содержащих остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:9, соответственно;

в) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 12D6-23, содержащих остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно;

г) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 12D6-24, содержащих остатки 1-119 и 1-112 SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:9, соответственно;

д) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 5F11-17, содержащих остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно;

е) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 5F11-23, содержащих остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:28, соответственно;

ж) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 5F11-45, содержащих остатки 1-117 и 1-111 SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, соответственно;

з) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 8E8-56, содержащих остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:42 и SEQ ID NO:43, соответственно;

и) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 8E8-62, содержащих остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:44 и SEQ ID NO:45, соответственно;

й) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 8E8-67, содержащих остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:47, соответственно;

к) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 8E8-70, содержащих остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:45 и SEQ ID NO:49, соответственно;

л) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 8E8-71, содержащих остатки 1-122 и 1-112 SEQ ID NO:50 и SEQ ID NO:51, соответственно;

м) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 5G7-22, содержащих остатки 1-113 и 1-107 SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:55, соответственно;

н) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 5G7-25, содержащих остатки 1-113 и 1-107 SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно;

о) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 19G3-11, содержащих остатки 1-112 и 1-112 SEQ ID NO:60 и SEQ ID NO:62, соответственно; и

р) переменных областей тяжелых и легких цепей антитела 19G3-22, содержащих остатки 1-112 и 1-112 SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:64, соответственно.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой и/или легкой цепей антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп. 1-6.

8. Экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 7.

9. Клетка, трансформированная экспрессирующим вектором по п. 8.

10. Способ получения антитела к CD40 человека или его антигенсвязывающей части, включающий:

- а) экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке по п. 9; и
- б) выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а) антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп. 1-6; и
- б) носитель.

12. Способ стимуляции иммунного ответа у индивидуума, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по п. 11.

13. Способ по п. 12, где у индивидуума выявлена опухоль и стимулируют иммунный ответ против опухоли.

14. Способ по п. 12, где у индивидуума выявлена хроническая вирусная инфекция и стимулируют иммунный ответ против вирусной инфекции.

15. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 11.

16. Способ по п. 15, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из: рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки/шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака яичка, рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака толстого кишечника, рака почки, рака головы и шеи, рака легких, рака желудка, рака половых клеток, злокачественной опухоли кости, рака печени, рака щитовидной железы, рака кожи, неоплазии центральной нервной системы, лимфомы, лейкоза, миеломы, саркомы и связанной с вирусом злокачественной опухоли.

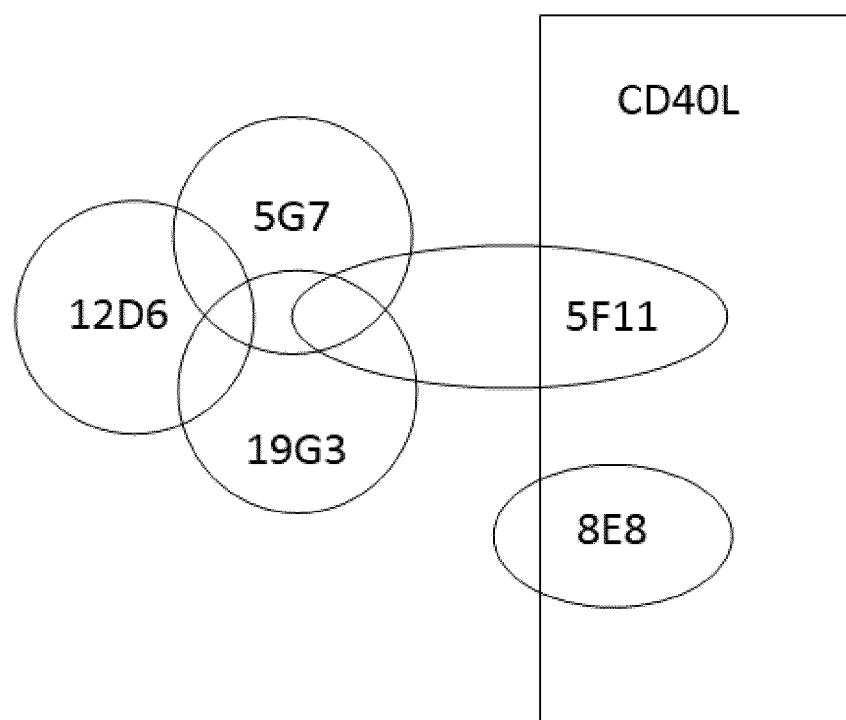
17. Способ лечения хронической вирусной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 11.

ФИГ. 1

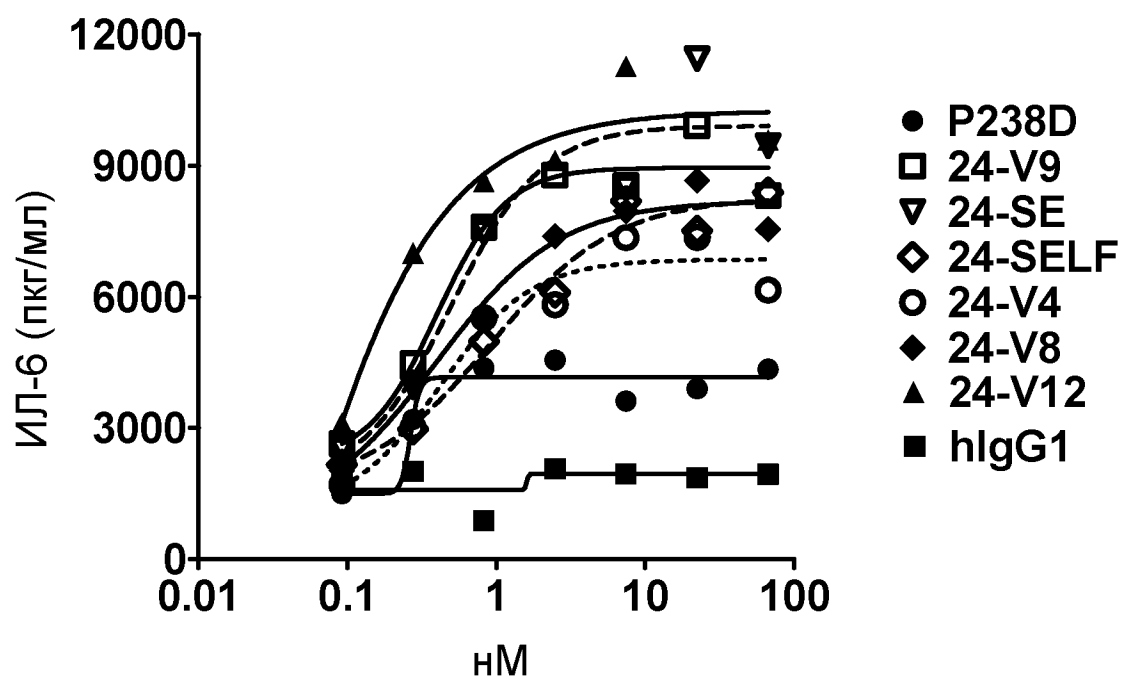
Константный домен IgG1f человека (SEQ ID NO: 65)
Перенумерованные 118 – 446

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS	177
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	237
PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNV YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	297
D E D EG	
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE	357
F R	
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW	417
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG	446

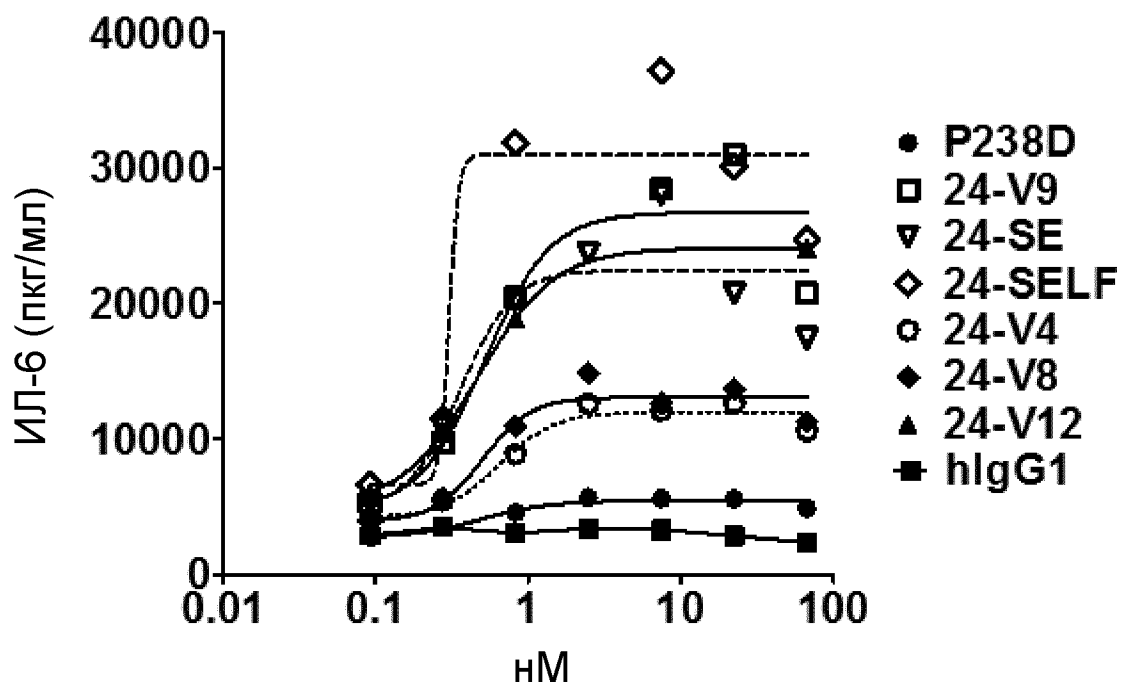
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

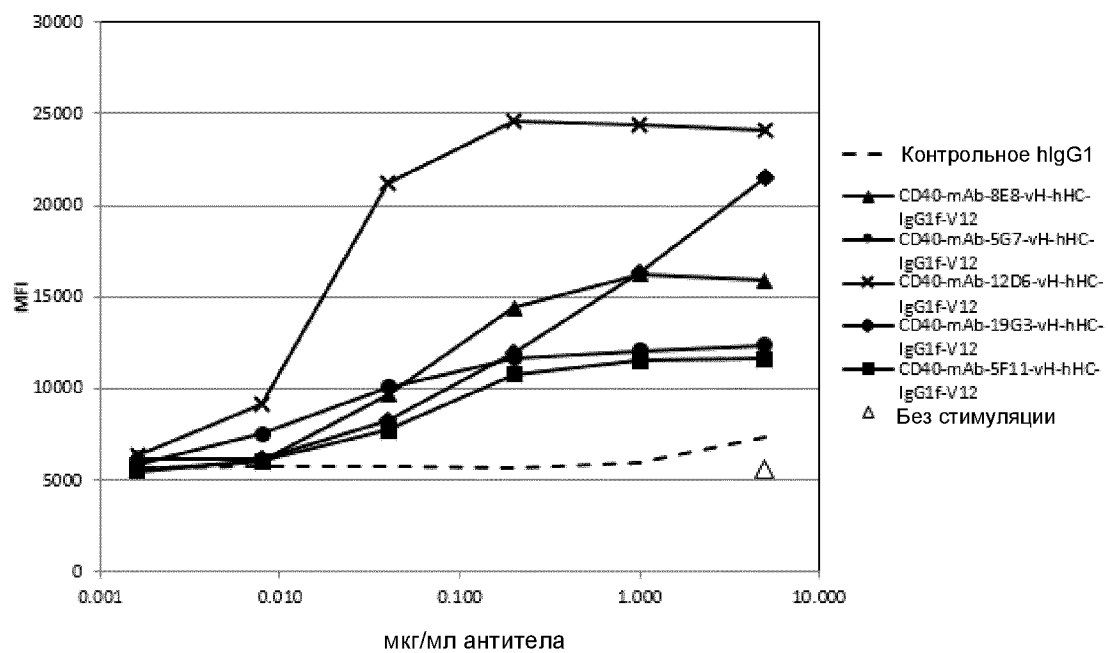


ФИГ. 3В



ФИГ. 4

CD54 (MFI)



ФИГ. 5

