

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037882

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.31

(21) Номер заявки
201890834

(22) Дата подачи заявки
2016.09.30

(51) Int. Cl. C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕ
ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ CD40, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/234,812

(32) 2015.09.30

(33) US

(43) 2018.12.28

(86) PCT/US2016/054764

(87) WO 2017/059243 2017.04.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Франссон Йохан (CA), Ким Пол,
Куигли Майкл, Смит Андресса,
Тепляков Алексей, Чжоу Хун (US)

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

(56) US-A1-20140120103
US-A1-20050202531
US-A1-20130243795
US-A1-20050054019
US-A1-20090104204
WO-A1-2014126254
US-A1-20140178388
US-A1-20090311245

(57) Изобретение относится к агонистическим антителам, специфически связывающим человеческий CD40, полинуклеотидам, кодирующим антитела или антигенсвязывающие фрагменты, и способам их получения и применения.

037882

B1

037882

B1

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам, специфически связывающим человеческий CD40, полинуклеотидам, кодирующим антитела или антигенсвязывающие фрагменты, и способам их получения и применения.

Предпосылки создания изобретения

Молекула CD40 клеточной поверхности является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) и ключевым регулятором как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. CD40 экспрессируется на человеческих антигенпредставляющих клетках, в частности В-клетках, дендритных клетках и макрофагах, а также на фибробластах, гладкомышечных клетках, эндотелиальных клетках и эпителиальных клетках. CD40 также экспрессируется в широком диапазоне опухолевых клеток, включая клетки всех В-лимфом, 30-70% солидных опухолей, меланом и карцином.

Природный лиганд CD40, называемый CD154 или CD40L, в основном экспрессируется на активированных Т-лимфоцитах и тромбоцитах. Взаимодействие CD40 с CD40L на Т-клетках индуцирует как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ. CD40 регулирует эту пару лиганд-рецептор для активации В-клеток и других антигенпредставляющих клеток (АПК), включая дендритные клетки (ДК), стимулируя активацию Т-клеток. Например, активация CD40 на В-клетках индуцирует пролиферацию В-клеток, соматическую гипермутацию, дифференцировку в клетки, секретирующие антитела и переключение изотипов в зародышевых центрах вторичных лимфоидных органов. Исследования *in vitro* показали прямое влияние активации CD40 на продукцию цитокинов (например, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α), экспрессию молекул адгезии и костимуляторных рецепторов (например, ICAM, CD23, CD80 и CD86) и повышенную экспрессию главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, МНС класса II и транспортера ТАР посредством В-лимфоцитов.

Антитела к CD40 могут стимулировать противоопухолевые эффекты посредством различных механизмов, включая активацию антигенпредставляющих клеток, приводя к увеличению активности специфических к опухоли цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток (ЕК-клеток) или к прямому апоптозу опухолевых клеток, опосредованному антителами, или клеточной цитотоксичности CD40-положительных опухолей. Однако системное введение антител к CD40 также было связано с неблагоприятными побочными эффектами, такими как синдром высвобождения цитокинов.

Таким образом, существует потребность в улучшенных антителах к CD40 для терапии рака и усиления иммунного ответа.

Изложение сущности изобретения

В изобретении предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40 с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, причем для проявления агонистической активности антитела требуется его перекрестное сшивание.

В изобретении также предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, которое содержит определенные последовательности VH, VL, HCDR, LCDR, тяжелой цепи или легкой цепи, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий VH антитела, VL антитела, VH антитела и VL антитела, тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела или тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела изобретения.

В изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид изобретения.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор изобретения.

В изобретении также предложен способ продуцирования антитела изобретения, включающий культивирование клетки-хозяина изобретения в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцированного клеткой-хозяином.

В изобретении также предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела изобретения или фармацевтической композиции изобретения в течение времени, достаточного для лечения рака.

В изобретении также предложен способ повышения иммунного ответа, включающий введение требующему лечения субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела изобретения или фармацевтической композиции изобретения в течение времени, достаточного для повышения иммунного ответа.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом изобретения.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют В-клетки зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию В-клеток измеряли как увеличение

поверхностной экспрессии CD23 в отсутствие перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 1В показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют В-клетки зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию В-клеток измеряли как увеличение поверхностной экспрессии CD23 в присутствии перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 1С показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют В-клетки зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию В-клеток измеряли как увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в отсутствие перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 1D показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют В-клетки зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию В-клеток измеряли как увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в присутствии перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 2А показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют дендритные клетки (ДК) зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию ДК измеряли как увеличение поверхностной экспрессии CD83 в отсутствие перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 2В показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют дендритные клетки (ДК) зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию ДК измеряли как увеличение поверхностной экспрессии CD83 в присутствии перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 2С показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют дендритные клетки (ДК) зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию ДК измеряли как увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в отсутствие перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 2D показано, что антитела, специфически связывающие человеческий CD40, активируют дендритные клетки (ДК) зависимым от перекрестного сшивания образом. Активацию ДК измеряли как увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в присутствии перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9 и т.п. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 3 показано выравнивание аминокислотной последовательности остатков 1-98 области VH С40М9 (С40Н43; SEQ ID NO: 60) и гена зародышевой линии человека IGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73; на фигуре показан как элемент IGHV4-39). Аминокислоты областей HCDR1 и HCDR2 подчеркнуты. Каркасы С40М9 и IGHV4-39*01 различаются 3 аминокислотами.

На фиг. 4 показано выравнивание аминокислотной последовательности остатков 1-94 области VL С40М18 (С40L64; SEQ ID NO: 66) и гена зародышевой линии человека IGLV3-1 (SEQ ID NO: 86). Аминокислотные последовательности областей LCDR1 и LCDR2 подчеркнуты. Каркас С40М18 отличается от каркаса IGLV3-1 2 аминокислотами.

На фиг. 5 показана кристаллическая структура С40М109 в комплексе с CD40.

На фиг. 6 показаны в виде рисунка остатки эпитопа и паратопа С40В126. Нумерация остатков CD40 приведена в соответствии с SEQ ID NO: 75. Нумерация остатков VH и VL С40М126 приведена в соответствии с SEQ ID NO: 62 и 69 соответственно.

На фиг. 7 показано, что С40М126 более эффективно при активации дендритных клеток по сравнению с контрольным антителом СР-870,893 и что С40М9 имеет минимальный агонизм, независимый от перекрестного сшивания. Активацию ДК измеряли как увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в отсутствие перекрестно сшивающего агента. М9 относится к антителу С40М9, а М126 относится к антителу С40М126. Контрольный образец: СР-870,893.

На фиг. 8 показано транзитное уменьшение количества тромбоцитов у животных, которым вводили контрольное антитело СР-870,893 в дозе 10 мг/мл, в то время как введение С40М9 или С40М126 не приводило к уменьшению количества тромбоцитов. Показаны результаты для двух отдельных животных на группу.

На фиг. 9 показано увеличение продукции IL-6 (пг/мл) у животных, которым вводили контрольное антитело СР-870,893 в дозе 10 мг/мл, по сравнению с животными, которым вводили С40М9 или С40М126. Показаны результаты для двух отдельных животных на группу.

Подробное описание изобретения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что используемые в настоящем документе термины предназначены только в целях описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все используемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное специалисту среднего уровня в области, к которой относится изобре-

ние.

В рамках настоящего документа применение форм единственного числа и союза "и" включает ссылки на множественное число, если из контекста четко не следует иное.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе.

Термины "специфическое связывание", или "специфически связывается", или "связывается" относятся к антителу, проявляющему большее высокую аффинность при связывании с человеческим CD40 по сравнению с неродственными антигенами. Как правило, связывание антитела с человеческим CD40 характеризуется константой диссоциации (K_D) 1×10^{-8} М или менее, например 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее или 1×10^{-12} М или менее, как правило, K_D , которая по меньшей мере в 100 раз меньше K_D связывания с неродственным антигеном (например, бычьим сывороточным альбумином (БСА), казеином). Константу диссоциации можно измерять, используя стандартные методики. Однако антитела, специфически связывающие человеческий CD40, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например в отношении такого же антигена других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca fascicularis* (яванский макак, cyno), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная игрушка, marmoset). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термин "антитела" подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. "Полноразмерные антитела" состоят из двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимно соединенных посредством дисульфидных связей, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, именуемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая область VH и VL состоит из трех участков CDR и четырех участков FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

"Области, определяющие комплементарность (CDR)" представляют в антителе "антигенсвязывающие сайты". CDR можно определять, используя разные термины: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основании вариабельности последовательностей (Wu and Kabat, J. Exp. Med. 132:211-50, 1970; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); (ii) "гипервариабельные области", HVR или HV, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям вариабельных доменов антитела, являющимся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-17, 1987). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003. Используемые в настоящем документе обозначения CDR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабату, Чотиа или IMGT, если в данном описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского полноразмерного антитела. Иллюстративными антигенсвязывающими фрагментами являются определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и/или 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и/или 3, вариабельная область тяжелой цепи (VH) или вариабельная область легкой цепи (VL), фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), состоящие либо из одного домена VH, либо из одного домена VL. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару

внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными цепочками антител с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, таких как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международной патентной публикации № WO 1998/44001, международной патентной публикации № WO 1988/01649; международной патентной публикации № WO 1994/13804; международной патентной публикации № WO 1992/01047.

"Моноклональным антителом" называется популяция антител с одинаковым аминокислотным составом в каждой тяжелой и каждой легкой цепи за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела. Моноклональные антитела, как правило, связываются с одним антигенным эпитопом, за исключением мультиспецифических моноклональных антител, которые связываются с двумя или более отличными антигенами или эпитопами. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя отличными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональные антитела могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими или моновалентными, бивалентными или мультивалентными. Термин "моноклональное антитело" включает мультиспецифическое антитело, например биспецифическое антитело или триспецифическое антитело.

Термин "выделенное антитело" означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, по существу не содержащие других антител, имеющих разные значения антигенной специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с человеческим CD40 по существу не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от CD40 человека). В случае биспецифического антитела биспецифическое антитело специфически связывается с двумя представляющими интерес антигенами и по существу не содержит антител, специфически связывающихся антигены, отличные от двух представляющих интерес антигенов. Термин "выделенное антитело" включает антитела, выделенные так, чтобы иметь более высокую степень чистоты, такие как антитела, являющиеся чистыми на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

"Гуманизированные антитела" означают антитела, в которых по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а каркасы вариабельной области получены из последовательностей человеческого иммуноглобулина.

Гуманизированные антитела могут включать намеренно введенные мутации в каркасных областях, в результате чего каркасная область может не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или последовательностей генов зародышевой линии.

Термин "человеческие антитела" относится к антителам, имеющим вариабельные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные области, так и все шесть CDR получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепей, которые получены из последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области антитела получены из системы, в которой применяется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулинов. Такими иллюстративными системами являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе. Человеческое антитело обычно содержит аминокислотные отличия по сравнению с зародышевой линией человека или перестроенные последовательности иммуноглобулинов, обусловленные, например, соматическими мутациями природного происхождения или намеренным введением замен в каркасный или антигенсвязывающий сайт и изменениями аминокислот, введенными во время клонирования и рекомбинации VDJ у животных, отличных от человека. Как правило, человеческое антитело по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии человека или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях человеческое антитело может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000, или синтетические HCDR3, включенные в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемые на фаге, например, как описано в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO 2009/085462.

Термин "рекомбинантный" относится к антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами.

Термин "эпитоп" означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных групп компонентов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные зарядовые характеристики. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих

конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка.

Термин "мультиспецифическое" относится к антителу, которое специфически связывает по меньшей мере два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена, например три, четыре или пять разных антигенов или эпитопов.

Термин "биспецифическое" относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами или может связывать эпитоп, который является общим для двух или более различных антигенов.

Термин "вариант" относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификаций, например замен, вставок или делеций.

Термин "вектор" относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы или может быть перемещен между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или селективные маркеры, функция которых состоит в том, чтобы способствовать удвоению или сохранению таких полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является типичным примером полинуклеотида.

Термин "полипептид" или "белок" относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться "пептидами".

CD40 или huCD40 относится к человеческому белку CD40. CD40 также известен как представитель 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF5), рецептор CD40L или рецептор CD154. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CD40 приведена в SEQ ID NO: 75. Человеческий полноразмерный белок CD40 представляет собой мембранный белок I типа, содержащий 277 аминокислот. Сигнальная последовательность охватывает остатки 1-20, внеклеточный домен охватывает остатки 21-193, трансмембранный домен охватывает остатки 194-215, а цитоплазматический домен охватывает остатки 216-277 с SEQ ID NO: 75. Во всем тексте описания "внеклеточный домен CD40", CD40-ECD, относится к фрагменту CD40, состоящему из остатков 21-193 с SEQ ID NO: 75.

Термин "агонист" или "агонистическое" относится к антителу, специфически связывающему человеческий CD40, которое после связывания CD40 индуцирует активацию В-клеток и/или дендритных клеток (ДК). Активацию В-клеток и ДК можно измерять путем измерения увеличения пролиферации В-клеток или путем измерения повышающей регуляции любого из поверхностных маркеров CD23, CD80, CD83, CD86 и HLA-DR на В-клетках или CD80, CD83, CD86 и HLA-DR на ДК. Агонист может индуцировать активацию В-клеток и/или ДК статистически значимым образом по сравнению с контрольным образцом без антитела.

Термин "перекрестное сшивание" относится к мультимеризации CD40 более высокого порядка на клетках, индуцированных антителом, которое специфически связывает CD40 человека, связанный с FcγRIIb в цис- или транс-положении, что приводит к индукции агонистической активности CD40. Перекрестное сшивание можно оценить *in vitro* посредством использования в качестве перекрестно сшивающего агента антитела к F(ab')₂ человека, как описано в настоящем документе.

Выражение "для проявления агонистической активности требуется перекрестное сшивание" означает, что антитело дозозависимым образом индуцирует экспрессию CD23 на В-клетках и поверхностную экспрессию CD83 на дендритных клетках в присутствии перекрестно сшивающего линкера, представляющего собой антитело к человеческому F(ab')₂ в концентрации 20 мкг/мл, и при этом в отсутствие перекрестно сшивающего линкера антитело не влияет на поверхностную экспрессию CD23 на В-клетках и поверхностную экспрессию CD83 на дендритных клетках при измерении поверхностной экспрессии методом проточной цитометрии с использованием способов, описанных в примере 1. Отсутствие влияния означает, что сигнал, полученный при проточной цитометрии, указывающий на поверхностную экспрессию CD23 и CD83, находится в пределах стандартного отклонения (CO) ±1 кривой титрования антител при концентрациях антител в диапазоне от 1×10⁻¹² до 1×10⁻⁶ M.

Термин "около" означает "в пределах приемлемого диапазона ошибки" для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других местах описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин "около" означает "в пределах одного стандартного отклонения" в соответствии с практикой, принятой в данной области, или "в диапазоне до 5%" в зависимости от того, что больше.

Выражение "в комбинации с" означает, что два или более терапевтических средств вместе вводят субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

В настоящем документе использованы общепринятые одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как приведено в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспартат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамин	Glu	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Агонистические антитела, специфически связывающие человеческий CD40.

В настоящем изобретении предложены агонистические антитела, специфически связывающие человеческий CD40, являющиеся эффективными при активации антигенпредставляющих клеток (АПК) и В-клеток. В отсутствие перекрестного сшивания антитела могут демонстрировать минимальную или отсутствующую агонистическую активность, таким образом, эти антитела, сохраняя эффективность, могут иметь улучшенный профиль безопасности по сравнению с другими антителами к CD40, находящимися в стадии клинической разработки для применения при онкологических показаниях.

Антитело CP-870,893, являющееся агонистом CD40, разработанное как IgG2 дикого типа, ранее протестировано в клинических исследованиях с участием пациентов с раком поджелудочной железы или меланомой. CP-870,893 способно активировать АПК без необходимости в перекрестном сшивании и является приблизительно в 20 раз более эффективным в отношении активации В-клеток по сравнению с активацией дендритных клеток. Эта суперагонистическая активность в качестве двухвалентного растворимого mAb в сочетании с преимущественной активацией В-клеток может приводить к синдрому высвобождения цитокинов (CRS), индуцированному интерлейкином-6 (IL-6), секретируемым В-клетками. В клинических исследованиях с участием пациентов наиболее частыми побочными эффектами этого антитела было развитие умеренного CRS, характеризующегося ознобом, лихорадкой, ригидностью мышц и другими симптомами, наблюдаемыми в день внутривенной инфузии антитела. Влияние CP-870,893 на В-клетки может, таким образом, приводить к ограничивающей дозу токсичности при применении дозы препарата, недостаточной для активации АПК.

Агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, требующие для проявления своей агонистической активности перекрестного сшивания, могут обладать сниженной CRS-индуцированной потенциальной токсичностью. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, предполагают, что на периферии циркулирующие АПК с меньшей вероятностью будут активироваться агонистическими антителами изобретения, специфически связывающими CD40, поскольку для того, чтобы произошла значимая мультимеризация более высокого порядка в результате перекрестного сшивания с FcγR и привела к последующей активации АПК, антитела должны достичь тканей. Активация АПК (например, дендритных клеток) может обладать более высокой клинической значимостью, чем активация В-клеток. Терапия рака агонистом CD40 тесно связана с активацией Т-клеток (French et al., 1999, Nature Medicine, 548-553; van Kooten et al., 2000, J. Leucoc. Biol., 67:2-17; Sotomayor et al., 1999, Nature Medicine, 5:780-787), и эта активация Т-клеток зависит от активации специализированных антигенпредставляющих клеток, в частности дендритных клеток (Melief et al., 2000, 75: 235-282).

В изобретении предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40 с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее CD40 с SEQ ID NO: 75, причем для агонистической активности антитела требуется его перекрестное сшивание.

CD40 представляет собой экспрессируемый на клеточной поверхности гликопротеин, который относится к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) и играет центральную роль в иммунной системе. Он экспрессируется на различных иммунных клетках, таких как В-клетки, дендритные клетки, моноциты и макрофаги, которые активируются при передаче сигнала посредством CD40 (обзор Tasci et al., 2001, *Cell. Mol. Life. Sci.*, (58), 4-43).

Активация дендритных клеток и В-клеток, опосредованная передачей сигнала CD40, запускает несколько биологических событий, включая активацию иммунных клеток, пролиферацию и продукцию цитокинов и хемокинов. Способы определения активации дендритных клеток и В-клеток, связанной с CD40, известны в данной области (Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol. Life Sci.*, 58:40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17) и описаны в настоящем документе. Иллюстративным способом является оценка усиления экспрессии поверхностных маркеров CD23, CD80, CD83, CD86 и HLA-DR или их комбинации с использованием стандартных способов, таких как цитометрия.

Зависимость агонистической активности от перекрестного сшивания можно оценить *in vitro*, используя известные способы. Например, активацию В-клеток или ДК можно оценить в отсутствие и в присутствии перекрестно сшивающего линкера, такого как антитело к иммуноглобулину. *In vivo* перекрестное сшивание обычно происходит посредством взаимодействия Fc антитела с FcγR.

Иллюстративными агонистическими антителами, специфически связывающими человеческий CD40, для проявления агонистической активности которых требуется перекрестное сшивание, являются антитела C40M67, C40M66, C40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40M12, C40M102, C40M103, C40M104, C40M105 и C40M121, описанные в настоящем документе.

Иллюстративным агонистическим антителом, специфически связывающим человеческий CD40, которое оказывает агонистическое действие на CD40 независимым от перекрестного сшивания образом, является антитело C40M126. C40M126 имеет мутацию S267E в области Fc, преобразующую антитело в независимый от перекрестного сшивания агонист. C40M126 и зависимое от перекрестного сшивания агонистическое mAb C40M121 имеют идентичные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, за исключением мутации S267E.

В изобретении также предложено выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, которое по результатам измерения методом проточной цитометрии индуцирует экспрессию CD80, CD83, CD86 и HLA-DR на человеческих дендритных клетках.

В некоторых вариантах осуществления выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, по результатам измерения методом проточной цитометрии индуцирует экспрессию CD23, CD80, CD83, CD86 и HLA-DR на человеческих В-клетках.

В некоторых вариантах осуществления выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, по результатам измерения методом проточной цитометрии индуцирует экспрессию CD83 на человеческих дендритных клетках.

В некоторых вариантах осуществления выделенное агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, по результатам измерения методом проточной цитометрии индуцирует экспрессию CD23 на человеческих В-клетках.

В изобретении также предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие человеческий CD40 с SEQ ID NO: 75, содержащие переменную область тяжелой цепи HCDR1 с SEQ ID NO: 5, HCDR2 с SEQ ID NO: 10, HCDR3 с SEQ ID NO: 18, переменную область легкой цепи LCDR1 с SEQ ID NO: 32, LCDR2 с SEQ ID NO: 34 и LCDR3 с SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческим CD40 в пределах остатков 46-64 или 75-76 с SEQ ID NO: 75. Термин "в пределах" означает, что 80% или более остатков эпитопа антитела связываются с остатком в пределах отрезков аминокислот 46-64 или 75-76 и что до 20% остатков эпитопа антитела связываются с остатком за пределами упомянутых отрезков аминокислот 46-64 или 75-76.

Эпитоп CD40, связывающийся с антителом, может быть определен, например, с использованием обмена водорода/дейтерия (обмен H/D) или путем анализа кристаллической структуры антитела в комплексе с CD40. Остатки эпитопа представляют собой остатки, защищенные антителом по меньшей мере на 5% разности уровней дейтерирования посредством обмена атомов водорода с атомами дейтерия (H/D) или экспонируемые на поверхности аминокислотные остатки, определенные как связывающие антитело в кристаллической структуре комплекса антитела и CD40. В кристаллической структуре комплекса антитела и CD40 остатками эпитопа являются те остатки CD40, которые находятся на расстоянии в пределах 4 Å или менее от любого из остатков CDR антитела.

При анализе обмена атомов водорода с атомами дейтерия (H/D) белок CD40 инкубируют в присут-

ствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение заданных периодов времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). В иллюстративном анализе 5 мкл исследуемого антитела (10 мкг) или 5 мкл комплекса CD40 и исследуемого антитела (10 и 7,35 мкг соответственно) инкубируют с 120 мкл буферного раствора для мечения оксидом дейтерия (50 мМ фосфат, 100 мМ хлорид натрия при pH 7,4) в течение 0, 60, 300, 1800, 7200 и 14 400 с. Реакцию обмена дейтерия гасят добавлением 63 мкл 5 М гидрохлорида гуанидина, и конечный уровень pH составляет 2,5. Погащенный образец подвергают расщеплению на колонке пепсином/протеазой типа XIII и анализу ЖХ-МС. Для расщепления пепсином/протеазой типа XIII денатурируют 5 мкг образца в 125 мкл контрольного буферного раствора (50 мМ фосфата, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4) посредством добавления 63 мкл 5 М гидрохлорида гуанидина (конечный уровень pH составляет 2,5) и инкубации смеси в течение 3 мин. Затем смесь подвергают расщеплению пепсином/протеазой типа XIII и полученные в результате пептиды анализируют с использованием системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС), состоящей из хроматографа Waters Acquity UPLC, соединенного с квадрупольным масс-спектрометром на платформе Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Исходные данные МС обрабатывают с использованием программного обеспечения HDX WorkBench, предназначенного для анализа данных МС обмена H/D. Концентрации дейтерия рассчитывают с использованием средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t_0). Идентификацию пептида осуществляют путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью CD40 с использованием программы Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составляет 20 ч./млн и 0,05 Да соответственно.

Для рентгеновской кристаллографии CD40 и исследуемое антитело экспрессируют и очищают с использованием стандартных протоколов. Комплекс CD40/исследуемое антитело инкубируют в течение ночи при 4°C, концентрируют и отделяют от не образовавших комплекс соединений с помощью эксклюзионной хроматографии. Комплекс кристаллизуют методом паровой диффузии из различных известных испытуемых растворов, например растворов, содержащих ПЭГ3350, цитрат аммония и 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (МЭС).

Антитела, связывающие человеческий CD40 в пределах остатков 46-64 и 75-76 с SEQ ID NO: 75, могут быть образованы путем выделения антител, связывающих CD40, с использованием библиотек фогового дисплея, отбора антител, конкурирующих с эталонным антителом C40M126 (VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69) за связывание с CD40 на 100%, и подтверждения эпитопа полученных антител путем решения кристаллической структуры комплекса антитело/CD40. В альтернативном варианте осуществления можно иммунизировать мышей, крыс или кроликов с использованием пептидов, охватывающих остатки 46-64 и 75-76 с SEQ ID NO: 75, и связывание образовавшихся антител можно оценивать в пределах упомянутой области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

связывается с человеческим CD40 с SEQ ID NO: 75 с константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-9} М или менее при измерении K_D с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,01% полисорбат 20 (PS-20) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; или

требует перекрестного сшивания для проявления агонистической активности на В-клетках и дендритных клетках (ДК), причем агонистическую активность на В-клетках измеряют посредством поверхностной экспрессии CD23 на В-клетках, а агонистическую активность на ДК измеряют посредством поверхностной экспрессии CD83 на ДК в присутствии перекрестно сшивающего агента (антитела к $F(ab')_2$ человека) в концентрации 20 мкг/мл, а поверхностную экспрессию CD23 и CD83 измеряют с использованием проточной цитометрии.

Аффинность антитела к человеческому CD40 можно определить экспериментально с использованием любого приемлемого способа. Иллюстративный способ включает применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, твердофазный иммуносорбентный ферментный анализ (ИФА) или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности конкретного антитела к CD40 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} и K_{off}), как правило, выполняют в стандартизованных условиях и с применением стандартизованного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, для измерений может находиться в пределах 5-33%, оказываясь в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин "около" в отношении значения K_D характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для значения K_D , равного 1×10^{-9} М, составляет до

$\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

Для анализов активации В-клеток человеческие В-клетки могут быть выделены из свежих или замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) с использованием набора для отрицательного выделения по В-клеткам в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi). Для анализов активации ДК человеческие моноциты могут быть выделены с использованием набора для отрицательного выделения по CD14 в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi) из замороженных/свежих PBMC, культивированных в течение 5 дней в полной среде RPMI (Invitrogen) в присутствии 100 нг/мл человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и человеческого IL-4 (Peprotech), причем пополнение сред проводят один раз в 2 дня. Титрование исследуемых антител к CD40 может быть выполнено путем их высевания в 96-луночный планшет с U-образным дном с добавлением либо В-клеток, либо ДК и инкубацией смеси в течение 15 мин при комнатной температуре. Можно добавлять питательные среды или перекрестно сшивающий линкер, представляющий собой антитело к F(ab')₂, в фиксированной концентрации 20 мкг/мл и инкубировать комплекс в течение 24 ч для проведения анализа активации ДК и в течение 48 ч для проведения анализа активации В-клеток при 37°C. В конце временной точки клетки можно собирать, дважды промывать проточным буферным раствором и инкубировать с человеческим Fc-блоком (Miltenyi) в течение 15 мин при комнатной температуре с последующей однократной отмывкой. Впоследствии клетки можно окрашивать для выявления маркеров активации CD23 или CD83 в течение 30 мин на льду с последующей двукратной отмывкой. Клетки анализируют с использованием системы BD Fortessa. В альтернативном варианте осуществления можно также оценивать поверхностную экспрессию маркеров активации CD80, CD86, HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления каркас тяжелой цепи антитела получен из человеческого IGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73), а каркас легкой цепи антитела получен из человеческого IGLV2-8*01 (SEQ ID NO: 87).

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 62 или 61 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 103, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 102, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG2.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E/I332E по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E/L328F по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E/I332E по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию S267E/L328F по сравнению с IgG1 дикого типа.

нению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69 и имеет изотип IgG1/λ, который необязательно содержит мутацию E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 129 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 155, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 128 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 154, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 127 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 153, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 162.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении солидной опухоли.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении меланомы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака легкого.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ).

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении немелкоклеточного рака легкого (НМКРЛ).

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении аденокарциномы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении почечно-клеточной карциномы (ПКК) (например, светлоклеточной почечной карциномы или папиллярно-клеточной почечной карциномы) или ее метастатического поражения.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении мезотелиомы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении носоглоточной карциномы (НГК).

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, в лечении колоректального рака.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака предстательной железы или резистентного к кастрации рака предстательной железы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака желудка.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака яичника.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака желудочно-кишечного тракта.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака печени.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака поджелудочной железы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака щитовидной железы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении плоскоклеточного рака головы и шеи.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении карциномы пищевода и желудочно-кишечного тракта.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака груди.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака фаллопиевой трубы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака головного мозга.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака уретры.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении эндометриоза.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении рака шейки матки.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении метастатического поражения рака.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении множественной миеломы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении лимфомы.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например в лечении лейкоза.

В изобретении также предложено выделенное агонистическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие CD40 с SEQ ID NO: 75, где антитело обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

связывается с человеческим CD40 с SEQ ID NO: 75 с константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-9} М или менее при измерении K_D с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,01% полисорбат 20 (PS-20) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; или

требует перекрестного сшивания для проявления агонистической активности на В-клетках и дендритных клетках (ДК), причем агонистическую активность на В-клетках измеряют посредством поверхностной экспрессии CD23 на В-клетках, а агонистическую активность на ДК измеряют посредством поверхностной экспрессии CD83 на ДК в присутствии перекрестно сшивающего агента (антитела к $F(ab')_2$ человека) в концентрации 20 мкг/мл, а поверхностную экспрессию CD23 и CD83 измеряют с использованием проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 1, 8, 22, 28, 38 или 42 соответственно, VH и VL с SEQ ID NO: 48 и 63 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 114 и 130 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 89 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 140 и 156 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 7, 25, 26, 39 или 44 соответственно, VH и VL с SEQ ID NO: 49 и 64 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 115 и 131 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 90 и 105 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 141 и 157 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 7, 24, 26, 39 или 44 соответственно, VH и VL с SEQ ID NO: 50 и 64 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 116 и 131 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 91 и 105 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 142 и 157 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 2, 7, 23, 26, 39 или 44 соответственно, VH и VL с SEQ ID NO: 51 и 64 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 117 и 131 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 92 и 105 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 143 и 157 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 3, 13, 17, 27, 33 и 43 соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 52 и 65 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 118 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 93 и 106 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 144 и 158 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 4, 6, 19, 27, 33 и 43 соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 53 и 65 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 119 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 94 и 106 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 145 и 158 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 4, 6, 20, 27, 33 и 43 соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 54 и 65 соответственно и/или тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 120 и 132 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления VH и VL кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 95 и 106 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления HC и LC кодируются полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 146 и 158 соответственно.

тельности вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 или 72, причем LCDR определяются по Кабату, Чотиа или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 или 62.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VL с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 или 72.

Последовательности HCDR и LCDR иллюстративных антител к CD40 изобретения показаны в табл. 2. Белковые и аминокислотные последовательности VH, VL, HC и LC иллюстративных антител к CD40 изобретения показаны в табл. 3.

Таблица 2

mAb	SEQ ID NO:							
	VH	VL	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
C40M67	48	63	1	8	22	28	38	42
C40M66	49	64	2	7	25	26	39	44
C40M63	50	64	2	7	24	26	39	44
C40M62	51	64	2	7	23	26	39	44
C40M59	52	65	3	13	17	27	33	43
C40M58	53	65	4	6	19	27	33	43
C40M56	54	65	4	6	20	27	33	43
C40M55	55	65	2	7	14	27	33	43
C40M51	56	65	4	6	21	27	33	43
C40M18	57	66	4	9	15	30	36	41
C40M17	58	67	4	11	16	29	37	40
C40M12	59	68	4	12	15	30	35	46
C40M9	60	69	5	10	18	32	34	47
C40M102	57	70	4	9	15	30	36	41
C40M103	57	71	4	9	15	31	36	41
C40M104	57	72	4	9	15	31	36	41
C40M105	61	69	5	10	18	32	34	47
C40M121	62	69	5	10	18	32	34	47
C40M126	62	69	5	10	18	32	34	47

Таблица 3

mAb	Аминокислотные последовательности				Последовательности ДНК			
	VH с SEQ ID NO:	VL с SEQ ID NO:	SEQ ID NO тяжелой цепи:	SEQ ID NO легкой цепи:	ДНК VH с SEQ ID NO:	ДНК VL с SEQ ID NO:	ДНК тяжелой цепи с SEQ ID NO:	ДНК легкой цепи с SEQ ID NO:
C40M67	48	63	114	130	89	104	140	156
C40M66	49	64	115	131	90	105	141	157
C40M63	50	64	116	131	91	105	142	157
C40M62	51	64	117	131	92	105	143	157
C40M59	52	65	118	132	93	106	144	158
C40M58	53	65	119	132	94	106	145	158
C40M56	54	65	120	132	95	106	146	158
C40M55	55	65	121	132	96	106	147	158
C40M51	56	65	122	132	97	106	148	158
C40M18	57	66	123	133	98	107	149	159
C40M17	58	67	124	134	99	108	150	160
C40M12	59	68	125	135	100	109	151	161
C40M9	60	69	126	136	101	110	152	162
C40M102	57	70	123	137	98	111	149	163
C40M103	57	71	123	138	98	112	149	164
C40M104	57	72	123	139	98	113	149	165
C40M105	61	69	127	136	102	110	153	162
C40M121	62	69	128	136	103	110	154	162
C40M126	62	69	129	136	103	110	155	162

Варианты агонистических антител изобретения, специфически связывающих CD40, входят в пределы объема настоящего изобретения. Например, варианты могут содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен в VH и/или VL, которые не оказывают нежелательного влияния на свойства антитела. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с аминокислотной последовательностью VH или VL изобретения.

Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = кол-во идентичных положений/общее кол-во положений $\times$ 100), с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с помощью алгоритма, описанного в E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120, штраф на длину гэпа 12 и штраф на гэп 4. В дополнение к этому процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма, описанного в Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), который встроен в программу GAP из программного пакета GCG (доступен на сайте <http://www.gcg.com>), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, с весом гэпов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и весом длины гэпов 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична VH с SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 или 62.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VL, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична VL с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 или 72.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична VH с SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 или 62, и VL, которая по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична VL с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71 или 72.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 63, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 64, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 64, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 64, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 52 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 53 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 55 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 56 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 66, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 58 и VL с SEQ ID NO: 67, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 68, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 70, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 71, причем VH, VL или как VH, так и

VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 72, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем одна или более последовательностей CDR содержат указанные аминокислотные последовательности на основе описанных в настоящем документе антител (например, антител, представленных в табл. 2) или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства агонистических антител изобретения, специфически связывающих CD40.

Агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, содержащее определенные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и их консервативные модификации, имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

связывается с человеческим CD40 с SEQ ID NO: 75 с константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-9} М или менее при измерении K_D с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,01% полисорбат 20 (PS-20) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; или

требует перекрестного сшивания для проявления агонистической активности на В-клетках и дендритных клетках (ДК), причем агонистическую активность на В-клетках измеряют посредством поверхностной экспрессии CD23 на В-клетках, а агонистическую активность на ДК измеряют посредством поверхностной экспрессии CD83 на ДК в присутствии перекрестно сшивающего агента (антитела к F(ab')₂ человека) в концентрации 20 мкг/мл, а поверхностную экспрессию CD23 и CD83 измеряют с использованием проточной цитометрии.

Термин "консервативная модификация" относится к модификациям аминокислот, которые не оказывают значимого влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего такие аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде может быть также замещен аланином, как описано ранее для способа мутагенеза с аланиновым сканированием (MacLennan et al., *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67, 1998; Sasaki et al., *Adv. Biophys.* 35:1-24, 1998). Аминокислотные замены в антителах изобретения могут быть выполнены хорошо известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4683195). Альтернативно могут быть созданы библиотеки вариантов, используя известные способы, например используя случайные (NNK) или неслучайные кодоны, например кодоны DVK, кодирующие 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных в результате вариантов антител могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, содержат пары вариабельных областей (одну для тяжелой цепи и одну для легкой цепи), специалист в данной области способен распознать, что альтернативные варианты осуществления могут содержать одиночные вариабельные области тяжелой или легкой цепи. Одиночную вариабельную область можно использовать для скрининга вариабельных доменов, способных к формированию двухдоменного специфического антигенсвязывающего фрагмента, способного, например, специфически связываться с CD40. Такой скрининг можно осуществлять методами скрининга фагового дисплея, например, с применением иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в международной патентной публикации № WO 1992/01047. При этом подходе используют отдельную колонию, содержащую клон либо с H, либо с L цепью, для заражения

полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), и полученный в результате двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен селективно отбирают в соответствии с описанными в настоящем документе методами фагового дисплея и тестируют его связывание с CD40 и агонистическую активность.

Антитела изобретения могут быть созданы с использованием различных технологий. Например, для создания моноклональных антител можно использовать метод гибридом по Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495, 1975. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например хомяка, крысу или обезьяну, иммунизируют CD40 или фрагментами CD40 человека или яванского макака (суно), такими как внеклеточный домен CD40, с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток immortalized гибридомы, отбирают на основе продукции антител с желаемыми свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Для продукции антител к CD40 изобретения можно использовать различных животных-хозяев. Например, для создания мышиных антител к человеческому CD40 можно использовать мышей линии Balb/c. Антитела, полученные от мышей линии Balb/c и от других животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы с использованием различных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями. Иллюстративные методы гуманизации, включающие отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают прививание CDR (патент США № 5225539), прививание определяющей специфичность области (SDR) (патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-499, 1991), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 20100261620), адаптацию к человеческим последовательностям (или адаптацию к человеческим каркасам) (патентная публикация США № US 2009/0118127), супергуманизацию (патент США № 7709226) и направляемую селекцию (Osbourn et al. (2005), *Methods* 36:61-68, 2005; патент США № 5565332). В этих способах CDR родительских антител переносят на человеческие каркасы, которые могут быть выбраны на основе их общей гомологии с родительскими каркасами, на основе длины каркаса CDR, гомологии или канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы с улучшением их селективности или аффинности к желаемому антигену путем включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методами, как описано в международной патентной публикации № WO 90/007861 и в международной патентной публикации

№ WO 92/22653, или путем введения изменения в любом из участков CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для создания человеческих антител к белку-мишени можно использовать трансгенных мышей, несущих в своем геноме локусы человеческих иммуноглобулинов (Ig), которые описаны, например, в международной патентной публикации № WO 90/04036; патенте США № 6150584; международной патентной публикации № WO 99/45962, международной патентной публикации № WO 02/066630, международной патентной публикации № WO 02/43478, Lonberg et al. (1994), *Nature* 368:856-9; Green et al. (1994), *Nature Genet.* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998), *Exp. Med.* 188:483-9; Lonberg and Huszar (1995), *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Bruggemann et al. (1991), *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326; Fishwild et al. (1996), *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez et al. (1997), *Nat. Genet.* 15:146-156; Green (1999), *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang et al. (1999) *Cancer Res.* 59:1236-1243; Bruggemann and Taussig (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458; международной патентной публикации № WO 02/043478). Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких мышей могут быть прерваны или делетированы, а в мышиный геном может быть встроен по меньшей мере один полный или частичный локус человеческого иммуноглобулина с использованием гомологичной или негомологичной рекомбинации, с использованием трансхромосом или с использованием минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно задействовать такие компании, как Regeneron (<http://www.regeneron.com>), Harbour Antibodies (<http://www.harbourantibodies.com>), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (<http://www.omtinc.net>), KyMab (<http://www.kymab.com>), Trianni (<http://www.trianni.com>) и Ablexis (<http://www.ablexis.com>).

Человеческие антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, где фаг конструируют с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) либо неспаренные или спаренные вариабельные области антител (Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000; Krebs et al., *J. Immunol. Meth.* 254:67-84, 2001; Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets et al., *PITAS (USA)*, 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991). Антитела изобретения могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде слитых белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в пуб-

ликации Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010 и в международной патентной публикации № WO 09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с CD40 человека и/или яванского макака (суно), и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессованы в виде полноразмерных IgG. Такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патентах США № 5223409; 5403484 и 5571698, выданных Ladner et al.; патентах США № 5427908 и 5580717, выданных Dower et al.; патентах США № 5969108 и 6172197, выданных McCafferty et al.; и патентах США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданных Griffiths et al.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с использованием любого приемлемого метода, такого как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован *de novo* в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Антитела изобретения могут быть человеческими или гуманизированными.

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас VH, полученный из человеческогоIGHV3-23*03 (SEQ ID NO: 79), IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 80), IGHV3-23*01 (SEQ ID NO: 81), IGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 82) или IGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас VL, полученный из человеческого IGKV3-20*1 (SEQ ID NO: 74), IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 84), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 85), IGLV3-1*01 (SEQ ID NO: 86) или IGLV2-8*01 (SEQ ID NO: 87).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV3-23*03 (SEQ ID NO: 79), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 74).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 80), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 84).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 80), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 85).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV3-23*01 (SEQ ID NO: 81), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 85).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 82), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGLV3-1*01 (SEQ ID NO: 86).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат каркас тяжелой цепи, полученный из человеческогоIGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73), и каркас легкой цепи, полученный из человеческого IGLV2-8*01 (SEQ ID NO: 87).

Антитела, содержащие переменные участки тяжелой или легкой цепи, "полученные из" конкретного каркаса или последовательности зародышевой линии, представляют собой антитела, полученные из системы, в которой используются зародышевые гены человеческого иммуноглобулина, например, из трансгенных мышей или из библиотек фаговых дисплеев, как описано ниже. Антитело, "полученное из" конкретного каркаса или последовательности зародышевой линии, может содержать отличия по аминокислотам по сравнению с последовательностью, из которой оно получено, например, из-за естественно возникающих соматических мутаций или намеренно введенных замен.

Антитела изобретения могут относиться к изотипу IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Антитела изобретения могут относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Антитела изобретения дополнительно могут быть сконструированы с возможностью получения модифицированного антитела со сходными или измененными свойствами по сравнению с родительским антителом. В антителах изобретения могут быть сконструированы области VH, VL, VH и VL, константные области, каркас VH, каркас VL или любой или все из шести участков CDR.

Антитела изобретения могут быть сконструированы путем прививания CDR. Одну или более последовательностей CDR антител изобретения можно прививать на другую каркасную последовательность. Прививание CDR можно осуществлять с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, и в некоторых вариантах осуществления всех и каждого из пронумерованных вариантов осуществления, перечисленных ниже, антитела в соответствии с изобретением содержат VH, которая содержит HCDR1 с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13, HCDR3 с SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 и VL, содержащую LCDR1 с SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32, LCDR2 с SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38 или 39, и/или LCDR3 с SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 или 47, при-

чем каркас VH получен не из IGHV3-23*03 (SEQ ID NO: 79), IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 80), IGHV3-23*01 (SEQ ID NO: 81), IGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 82) или IGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73), и каркас VL получен не из IGLV4-1*01 (SEQ ID NO: 84), IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 85), IGLV3-1*01 (SEQ ID NO: 86) или IGLV2-8*01 (SEQ ID NO: 87).

Используемые каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованной литературы, включающей последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК и кодируемые белковые последовательности человеческих генов вариабельных областей легкой и тяжелой цепей зародышевой линии можно найти в международной информационной системе IMGT®, international ImMunoGeneTics information system® <http://www-imgt.org>.

Каркасные последовательности, которые можно использовать для замены существующих каркасных последовательностей в антителах изобретения, представляют собой такие последовательности, которые имеют наибольшую процентную идентичность с родительскими каркасами.

Каркасные последовательности родительских и сконструированных антител можно подвергать дополнительной модификации, например, путем обратных мутаций, для восстановления и/или улучшения связывания полученного антитела с антигеном, как описано, например, в патенте США № 6180370. Каркасные последовательности родительских и сконструированных антител можно дополнительно подвергать модификациям путем получения мутаций в одном или более остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одной или более областей CDR, для удаления Т-клеточных эпитопов и, следовательно, уменьшения потенциальной иммуногенности антитела. Такой подход также называют "деиммунизацией", и более подробно он описан в патентной публикации США № 20030153043.

Остатки CDR антител изобретения можно подвергать мутации для улучшения одного или более свойств связывания интересующего антитела. Можно осуществлять сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез с целью введения мутации(ий), а влияние на связывание антитела или на другое интересующее функциональное свойство можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, как описано в настоящем документе и представлено в примерах. К иллюстративным заменам, которые можно вводить, относятся консервативные модификации, описанные выше. Более того, в пределах CDR, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

Можно получать мутации в области Fc антитела изобретения с целью модуляции эффекторных функций и фармакокинетических свойств антитела.

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат по меньшей мере одну замену в области Fc антитела.

Мутации в области Fc антитела изобретения могут быть получены с целью модуляции периода полужизни антитела. Например, мутацию M252Y/S254T/T256E можно вводить с целью увеличения периода полужизни полученного антитела (Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-240, 2006).

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит в области Fc по меньшей мере одну мутацию, усиливающую связывание антитела с FcγRIIb.

Выражение "усиливающий связывание антитела с FcγRIIb" относится к статистически значимому увеличению связывания (например, к уменьшению значения EC₅₀) FcγRIIb антителом изобретения, содержащим по меньшей мере одну мутацию в области Fc, по сравнению с аналогичным антителом без мутации.

Связывание антитела с FcγRIIb можно оценивать на клетках, сконструированных для экспрессии FcγRIIb, с использованием проточной цитометрии. В иллюстративном анализе связывания в 96-луночный планшет высевают 2×10^5 клеток на лунку и блокируют буферным раствором для окрашивания с бычьим сывороточным альбумином (BSA), BD Biosciences, г. Сан-Хосе, США) в течение 30 мин при 4°C. Клетки инкубируют с исследуемым антителом на льду в течение 1,5 ч при 4°C. После двукратного промывания буферным раствором для окрашивания BSA клетки инкубируют с меченым R-фикоэритрином (R-PE) вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 45 мин при 4°C. Клетки дважды промывают в буферном растворе для окрашивания, после чего повторно суспендируют в 150 мкл буферного раствора для окрашивания, содержащего разведенный в соотношении 1:200 краситель DRAQ7 для живых/мертвых клеток (Cell Signaling Technology, г. Данверс, США). Сигналы PE и DRAQ7 от окрашенных клеток определяют с помощью проточного цитометра Miltenyi MACSQuant (Miltenyi Biotec, г. Оберн, США) с использованием соответственно канала B2 и B4. Живые клетки стробируют по исключению DRAQ7, а средние геометрические значения сигналов флуоресценции определяют для сбора по меньшей мере 10000 случаев живых клеток. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo (Tree Star). Данные наносят на график как логарифм концентрации антител в зависимости от средних значений сигналов флуоресценции. С помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) выполняют нелинейный регрессионный анализ и рассчитывают значения EC₅₀.

Усиленное связывание с FcγRIIb агонистического антитела изобретения, специфически связываю-

шего человеческого CD40, может усилить перекрестное сшивание молекул CD40, что приводит к более сильной активации CD40 агонистическими антителами изобретения. Иллюстративные мутации Fc, приводящие к получению антител, имеющих усиленное связывание с FcγRIIb, представляют собой мутацию S267E, мутацию S267D, мутацию S267E/I332E, мутацию S267E/L328F, мутацию G236D/S267E и мутацию E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит мутацию S267E в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит мутацию S267E/I332E в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит мутацию S267E/L328F в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит мутацию E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая усиливает связывание антитела с рецептором Fcγ (FcγR) и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание с C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения в области Fc, в которых могут быть получены мутации для увеличения связывания антитела с активацией Fcγ и/или усиления эффекторных функций антитела, описаны, например, в патенте США № 6737056, патентной публикации США № 2015/0259434, Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604, Lazar et al., (2006), Proc. Natl. Acad. Sci., 103:4005-4010, Stavenhagen et al., (2007), Cancer Res. 67:8882-8890, Richards et al., (2008), Mol. Cancer Ther. 7:2517-2527, Diebolder et al. Science; опубликованных в сети Интернет 13 марта 2014 г.; doi:10.1126/science.1248943, и включают положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков соответствует индексу EU). Иллюстративные мутации, которые могут быть получены по одной или в комбинации, представляют собой: мутацию G236A, мутацию S239D, мутацию F243L, мутацию T256A, мутацию K290A, мутацию R292P, мутацию S298A, мутацию Y300L, мутацию V305L, мутацию K326A, мутацию A330K, мутацию I332E, мутацию E333A, мутацию K334A, мутацию A339T и мутацию P396L. Иллюстративные комбинированные замены, которые приводят к получению антител с повышенными ADCC или ADCP, представляют собой мутацию S239D/I332E, мутацию S298A/E333A/K334A, мутацию F243L/R292P/Y300L, мутацию F243L/R292P/Y300L/P396L, мутацию F243L/R292P/Y300L/V305L/P396L и мутацию G236A/S239D/I332E в IgG1.

Положения области Fc, в которых могут быть получены мутации для усиления CDC антитела, представляют собой те, которые описаны, например, в международной заявке на патент WO 2014/108198, Idusogie et al., (2001), J. Immunol. 166:2571-2575 и Moore et al., (2010), Mabs, 2:181-189, и включают положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Иллюстративные мутации, которые могут быть получены по одной или в комбинации, представляют собой мутацию S267E, мутацию F1268F, мутацию S324T, мутацию K326A, мутацию K326W, мутацию E333A, мутацию E345K, мутацию E345Q, мутацию E345R, мутацию E345Y, мутацию E430S, мутацию E430F и мутацию E430T. Иллюстративные комбинированные мутации, которые приводят к получению антител с повышенной CDC, представляют собой мутацию K326A/E333A, мутацию K326W/E333A, мутацию H268F/S324T, мутацию S267E/H268F, мутацию S267E/S324T и мутацию S267E/H268F/S324T в IgG1.

Способность моноклональных антител к индукции ADCC можно также усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания FcγRIIIa без изменения связывания с антигеном или активности CDC. Такие mAb можно получать, используя различные способы, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такие как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., Cytotechnology, 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., MABs; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение гибридной клеточной линии крысы YB2/0 в качестве линии

клеток-хозяев (Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфичной к гену α -1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., Biotechnol. Bioeng, 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., J. Biol. Chem. 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., Biotechnol. Bioeng. 93:851-861, 2006; Xhou et al., Biotechnol. Bioeng. 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы от около 0 до около 15%, например 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%.

В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, содержат 2-антенарную гликановую структуру с содержанием фукозы около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0%.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в пределах сахаридной цепи в положении Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентное содержание фукозосодержащих структур, относящихся ко всем гликоструктурам. Они могут быть охарактеризованы и количественно определены множеством способов, например: 1) с использованием времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные, и высокоманнозные структуры), как описано в международной патентной публикации № WO 2008/077546; 2) посредством ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и обнаружением/количественным определением методом ВЭЖХ (СВЭЖХ) с флуоресцентным обнаружением и/или ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС); 3) анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой или без обработки гликанов Asn297 ферментом Endo S или другим ферментом, который расщепляет связь между первым и вторым моносахаридами GlcNAc, сохраняя фукозу присоединенной к первому GlcNAc; 4) расщеплением mAb на составляющие пептиды посредством ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующим разделением, обнаружением и количественным определением методом ВЭЖХ-МС (СВЭЖХ-МС) или 5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb на Asn 297 посредством специфического ферментативного дегликозилирования ферментом PNGase F. Высвобожденные олигосахариды можно метить флуорофором, разделять и идентифицировать различными вспомогательными методами, которые позволяют точно охарактеризовать структуры гликанов посредством масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определить степень сialiрирования с помощью ионообменной ВЭЖХ (GlycoSep C), разделить и количественно оценить формы олигосахаридов по критерию гидрофильности с помощью ВЭЖХ с обычной фазой (GlycoSep N) и разделить и количественно оценить формы олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза с лазер-индуцированной флуоресценцией (HPCE-LIF).

Выражения "низкофукозный" или "с низким содержанием фукозы", используемые в описании, относятся к антителам с содержанием фукозы около 0-15%.

Выражения "нормофукозный" или "с нормальным содержанием фукозы", используемые в настоящем документе, относятся к антителам с содержанием фукозы более около 50%, как правило, более около 60, 70, 80 или более 85%.

Агонистические антитела изобретения, специфически связывающие CD40, имеющие усиленные ADCC, ADCP и/или CDC, могут использоваться для лечения гематологических злокачественных опухолей, экспрессирующих CD40.

Термины "антителозависимая клеточная цитотоксичность", "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" представляют собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, например естественными киллерными клетками, моноцитами, макрофагами и нейтрофилами, посредством гамма-рецепторов Fc (FcγR), экспрессирующихся на эффекторных клетках. Например, ЕК-клетки экспрессируют FcγRIIIa, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIIIa. Для оценки активности ADCC антител изобретения данное антитело можно добавлять к клеткам-мишеням в комбинации с эффекторными клетками иммунной системы, которые могут быть активированы комплексами антиген-антитело, что приводит к цитолизу клетки-мишени. Цитолиз по существу обнаруживают по высвобождению из лизированных клеток метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков). Иллюстративные эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и ЕК-клетки. Иллюстративные клетки-мишени включают клетки, экспрессирующие CD40.

"Антителозависимый клеточный фагоцитоз" (ADCP) относится к механизму уничтожения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. ADCP можно оценивать с использованием образовавшихся из моноцитов макрофагов в качестве эффекторных клеток и клеток, экспрессирующих CD40, сконструированных с

возможностью экспрессии GFP или другой маркирующей молекулы, в качестве клеток-мишеней. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 ч с исследуемым антителом к CD40 или без антитела. После инкубации клетки можно отделять с помощью аккутазы. Идентификацию макрофагов можно проводить с помощью антител к CD11b и к CD14, связанных с флуоресцентной меткой, а процент фагоцитоза можно определять на основании % флуоресцентного GFP в макрофагах CD11⁺CD14⁺ стандартными методами.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к механизму индукции гибели клеток, при котором эффекторный домен Fc связанного с мишенью антитела связывает и активирует компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, что облегчает ADCC посредством связывания на лейкоцитах рецепторов комплемента (например, CR3). CDC для клеток, экспрессирующих CD40, можно измерять, например высевая клетки, экспрессирующие CD40, в соответствующую питательную среду, добавляя в смесь антитела к CD40 с последующим добавлением объединенной человеческой сыворотки. После периода инкубации можно определять процентную долю (%) лизированных клеток как % клеток, окрашенных пропидия йодидом, в анализе цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) стандартными методами.

Термины "усиленная ADCC", "усиленная CDC" и "усиленный ADCP" относятся к статистически значимому увеличению ADCC, CDC и/или ADCP, опосредованному антителом изобретения, содержащим по меньшей мере одну мутацию в области Fc, по сравнению с аналогичным антителом без мутации. ADCC, CDC и/или ADCP определяют, например, в анализах, описанных в настоящем документе, и в анализах, описанных в патенте США № 8871204.

Кроме того, агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, могут быть модифицированы посттрансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или искусственная ковалентная модификация, такая как присоединение фрагментов полиэтиленгликоля (пэгилирование), и липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела изобретения могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (пэгилированы) с целью улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методами, известными специалистам в данной области. Отмечено, что конъюгация терапевтических антител с ПЭГ улучшает фармакодинамику, в то же время не оказывая влияния на функционирование (Knigh et al., *Platelets*, 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine*, 16:106-19, 2001; Alftan et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003).

Антитела изобретения или их антигенсвязывающие фрагменты, модифицированные с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биофизических характеристик, входят в пределы объема настоящего изобретения. Стабильность антитела определяется рядом факторов, включающих (1) внутреннюю укладку отдельных доменов, влияющих на их собственную стабильность; (2) поверхностные взаимодействия белков, влияющие на спаривание HC и LC; (3) глубину расположения полярных и заряженных остатков; (4) сеть Н-мостиков между полярными и заряженными остатками и (5) поверхностный заряд и распределение полярных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn et al., *J. Mol. Biol.* 305:989-1010, 2001). Остатки, способные дестабилизировать структуру, можно идентифицировать на основании кристаллической структуры антитела или, в определенных случаях, путем молекулярного моделирования, а влияние остатков на стабильность антитела можно исследовать путем создания и оценки вариантов, содержащих мутации в идентифицированных остатках. Один из способов увеличения стабильности антитела заключается в увеличении средней температуры перехода (T_m), измеряемой с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Как правило, T_m белка имеет прямую корреляцию с его стабильностью и обратную корреляцию с его подверженностью нарушению третичной структуры и денатурации в растворе и процессам деградации, которые зависят от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele et al., *Biopharm*, 13:36-46, 2000). Ряд исследований свидетельствует о корреляции между степенью физической стабильности структур, измеренной как термостабильность путем DSC, и измерениями физической стабильности, проведенными другими способами (Gupta et al., *AAPS PharmSci.* 5E8, 2003; Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 93:3076-89, 2004; Maa et al., *Int. J. Pharm.* 140:155-68, 1996; Bedu-Addo et al., *Pharm Res.* 21:1353-61, 2004; Remmele et al., *Pharm Res.* 15:200-8, 1997). Результаты исследований структур позволяют предположить, что T_m Fab влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего моноклонального антитела (mAb).

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения представляет собой биспецифическое антитело.

Агонистические антитела изобретения, специфически связывающие человеческий CD40, можно

конструировать в виде биспецифических антител, которые также входят в пределы объема настоящего изобретения.

Полноразмерные биспецифические антитела можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (например, путем обмена полумолекулами, обмена пары тяжелая цепь - легкая цепь) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, введя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле мутации, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях родительских моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из родительских моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы родительского моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно сконструировать так, чтобы они способствовали гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или две полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом. Можно использовать мутации F405L в одной тяжелой цепи и K409R в другой тяжелой цепи. Для получения биспецифических антител конструируют первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело так, чтобы они имели в области Fc мутацию F405L или K409R, антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирных областях могли претерпевать изомеризацию дисульфидной связи; таким образом, образуется биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невосстанавливающим.

Иллюстративными восстанавливающими агентами, которые могут быть использованы, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозэритритол (DTE), глутатион, трис-(2-карбоксиэтил)фосфин (TCPE), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 mM 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 mM дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Биспецифические антитела можно создать, например используя такие конструкции, как "выступ во впадину" (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатическое соответствие (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), доменное антитело, сконструированное посредством обмена цепей (SEEDbody) (EMD Serono) и Biclonic (Merus).

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию № WO 2006/028936). Вкратце, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергнуть мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, стимулируя образование гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После коэкспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Иллюстративными парами замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Для создания полноразмерных биспецифических антител изобретения можно использовать технологию CrossMAb. Антитела CrossMAb, дополнительно к применению стратегии содействия обмена Fab-плечами по типу "выступ во впадину", имеют в одной из половин плеч обмен доменами СН1 и CL для обеспечения правильного спаривания легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8242247).

Для создания полноразмерных биспецифических антител изобретения могут быть использованы другие стратегии перенаправления путем обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или внутри тяжелой цепи в биспецифических антителах (либо в одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, СНЗ с CL и СНЗ с СН1, как описано в патентных публикациях № WO 2009/080254, WO 2009/080251, WO 2009/018386 и WO 2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации

США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указаны модифицированные положения в первом домене CH3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

Для создания биспецифических антител изобретения можно использовать технологию LUZ-Y. В этой технологии к С-концам доменов CH3 присоединяют последовательность типа лейциновой застежки-молнии для управления сборкой гетеродимера из родительских mAb, которую удаляют после очистки, как описано Wranik et al., (2012), J. Biol. Chem. 287(52):42221-9.

Для создания биспецифических антител изобретения можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену избранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US 20070287170.

Как правило, мутации получают на уровне ДНК в молекуле, такой как константный домен антитела, стандартными способами.

Антитела изобретения могут быть сконструированы в различных хорошо известных форматах антител.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, где две стороны молекулы содержат Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух различных антител; молекулы слияния IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; молекулы Fc-слияния, где одноцепочечные Fv-молекулы или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слияние молекул Fab, в котором разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела на основе ScFv- и диател, а также антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела), в которых различные одноцепочечные Fv-молекулы, или различные диатела, или различные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем.

В изобретении также предложено агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, имеющее определенные последовательности VH и VL, причем VH кодируется первым полинуклеотидом, а VL кодируется вторым полинуклеотидом. Полинуклеотид может быть комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (кДНК) и может иметь оптимизированные кодоны для экспрессии в приемлемом хозяине. Оптимизация по кодонам является хорошо известной технологией.

Полинуклеотид, векторы, клетки-хозяева.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH антитела изобретения, VL антитела изобретения, тяжелую цепь антитела изобретения или легкую цепь антитела изобретения.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 или 62.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61 или 62 и VL с SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или 113.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь с SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128 или 129.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий легкую цепь с SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 или 139.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь с SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128 или 129 и легкую цепь с SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 или 139.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 или 165.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие VH или VL или их антигенсвязывающий фрагмент антител изобретения или тяжелую цепь и легкую цепь антител изобретения, могут быть функционально связаны с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой кДНК.

В изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы, вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловирусов, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения синтетического полинуклеотида изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение любым способом. Например, полинуклеотиды, кодирующие вариабельные области легкой и/или тяжелой цепей антител изобретения, необязательно соединенные с константными областями, встроены в экспрессионные векторы. Легкую и/или тяжелую цепи можно клонировать в одном или в разных экспрессионных векторах. Участки ДНК, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, могут быть функционально связаны в экспрессионном(ых) векторе(ах) с управляющими последовательностями, обеспечивающими экспрессию иммуноглобулиновых полипептидов. К таким управляющим последовательностям относятся сигнальные последовательности, промоторы (например, естественно ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансерные элементы и последовательности терминирования транскрипции, и их выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии антитела. После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, приемлемых для высокоуровневой экспрессии белков, кодируемых введенными полинуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 89 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 90 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 91 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 92 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 93 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 94 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 95 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 96 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 97 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 98 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 99 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 100 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 98 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 98 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 112.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 98 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 102 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 103 и полинуклеотид с SEQ ID NO: 110.

Как правило, приемлемые экспрессионные векторы могут реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат маркеры селекции, например, вызывающие резистентность к ампициллину, резистентность к гигромицину, резистентность к тетрациклину, резистентность к канамицину или резистентность к неомицину, чтобы обеспечивать обнаружение таких клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК.

Приемлемые промоторные и энхансерные элементы известны в данной области. Иллюстративные промоторы для экспрессии в эукариотической клетке включают промоторные и энхансерные элементы генов легкой и/или тяжелой цепей иммуноглобулинов; немедленно-ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных концевых повторах ретровируса; промотор мышинового металлотронеина-I и различные известные тканеспецифические промоторы. Выбор подходящего вектора и промотора вполне соответствует уровню обычного специалиста в данной области.

Иллюстративными векторами, которые могут быть использованы, являются бактериальные векторы pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические векторы: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza).

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов изобретения. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую введен вектор. Следует понимать, что термин "клетка-хозяин" служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды, такое потомство может не быть идентичным родительской клетке, но оно также может быть охвачено термином "клетка-хозяин", используемым в данном документе. Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей.

Escherichia coli, бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также полезны другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Иллюстративными эукариотическими клетками могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Иллюстративной клеточной линией миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHOK1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), Potelligent® CHOK2SV (Lonza), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

В изобретении также предложен способ продуцирования антитела по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцированного клеткой-хозяином. Способы получения антител и их очистки хорошо известны специалистам в данной области. После синтеза (химического либо рекомбинантного) полные антитела, их димеры, отдельные легкие и/или тяжелые цепи или другие фрагменты антител, такие как VH и/или VL, можно очищать в соответствии со стандартными методиками, включающими осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), электрофорез в геле и т.п. (по существу см. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Заявленное антитело может быть по существу чистым, например чистым по меньшей мере примерно на 80-85%, чистым по меньшей мере примерно на 85-90%, чистым по меньшей мере примерно на 90-95%, чистым по меньшей мере примерно на 98-99% или более, например не содержащим загрязняющих веществ, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т.д., отличных от заявленного антитела.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ получения агонистического антитела, специфически связывающего человеческий CD40, который включает

- объединение в экспрессионном векторе первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела;
- трансформацию этим экспрессионным вектором клетки-хозяина;
- культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, в которых экспрессируются VL и VH и образуется антитело; и
- выделение антитела из клетки-хозяина или культуральной среды.

Последовательности нуклеотидов VH или VL изобретения могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

Способы лечения.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, применяют в диагностике *in vitro* и *in vivo*, а также для лечения и профилактики. Например, антитела изобретения можно вводить в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo* или субъекту для лечения, профилактики и/или диагностики различных расстройств, таких как онкологические и инфекционные заболевания.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, например антитела C40M67, C40M66, C40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40M12, C40M102, C40M103, C40M104, C40M105, C40M121 и C40M126, можно применять для лечения и/или предотвращения любого состояния или заболевания, при котором усиленная передача сигнала CD40 может быть терапевтически эффективной и может уменьшать симптомы заболевания.

Способы по изобретению можно применять для лечения субъекта, принадлежащего к любой классификации животных. Примеры субъектов, которых можно лечить, включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Антитела изобретения также могут быть полезны в приготовлении лекарственного средства для проведения такого лечения, причем лекарственное средство готовят для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

В изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного антитела по изобретению, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для лечения рака.

Субъекты, которых можно лечить агонистическими антителами по изобретению, специфически связывающими человеческий CD40, являются субъектами, у которых диагностировано наличие рака головного мозга, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы и шеи, кожной или внутриглазной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака толстой кишки, гинекологической опухоли (например, саркомы матки, карциномы маточных труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища или карциномы вульвы), рака пищевода, рака тонкого кишечника, рака эндокринной системы (например, рака щитовидной железы, паращитовидной железы или надпочечников), сарком мягких тканей, лейкоза, миеломы, множественной миеломы, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, рака предстательной железы, хронического или острого лейкоза, солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарных лимфом, неходжкинской лимфомы, рака мочевого пузыря, рака печени, почечноклеточного рака, рака почки или мочеточника (например, почечноклеточной карциномы, карциномы почечной лоханки) или новообразований центральной нервной системы (например, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиом головного мозга или аденом гипофиза), глиомы или фибросаркомы.

В изобретении также предложен способ лечения солидной опухоли, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для лечения солидной опухоли.

В изобретении также предложен способ лечения гематологической злокачественной опухоли, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для лечения гематологической злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак легкого, рак шейки матки, рабдомиосаркому, нейробластому, меланому, рак мочевого пузыря или рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой меланому.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ).

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой неплоскоклеточный НМКРЛ.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой аденокарциному легкого.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой почечноклеточную карциному (ПКК) (например, светлоклеточную почечную карциному или папиллярную почечную карциному) или ее метастатическое поражение.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой мезотелиому.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой носоглоточную карциному (НГК).

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак простаты или кастрационно-резистентный рак простаты.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак печени.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой карциномы пищевода или желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак фаллопиевой трубы.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой рак уретры.

В изобретении также предложен способ усиления иммунного ответа, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для усиления иммунного ответа.

Термины "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, при котором целью является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, такого как развитие или распространение опухоли или опухолевых клеток, или обеспечение благоприятного или желаемого клинического результата в ходе лечения. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, отсутствие метастазов, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин "лечение" может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения субъекта. К требующим лечения относятся субъекты, у которых уже имеются нежелательные физиологические изменения или заболевания, а также субъекты, склонные к физиологическим изменениям или заболеванию.

Выражение "ингибирует рост" (например, в отношении опухолевых клеток) относится к определяемому снижению роста опухолевых клеток или опухолевой ткани *in vitro* или *in vivo* при приведении их в контакт с терапевтическим средством или комбинацией терапевтических средств по сравнению со снижением или замедлением роста таких же опухолевых клеток или опухолевой ткани в отсутствие терапевтического средства (средств). Ингибирование роста опухолевой клетки или опухолевой ткани *in vitro* или *in vivo* может составлять по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Иллюстративные показатели эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшение самочувствия пациента, снижение опухолевой нагрузки, прекращение или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие локализации в организме.

В изобретении также предложен способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества агонистического антитела, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для усиления иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления субъект обладает ослабленным иммунитетом.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет риск развития иммунодефицита. Субъект с иммунодефицитом может проходить или прошел химиотерапию или радиационную терапию.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет иммунодефицит или риск его развития в результате инфекции.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет вирусную инфекцию.

В изобретении также предложен способ лечения вирусной инфекции, включающий введение требующему этого субъекту терапевтически эффективного количества выделенного агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, в течение времени, достаточного для лечения воспалительного вирусной инфекции.

Введение/фармацевтические композиции.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, могут быть предложены в виде приемлемой фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может представлять собой разбавитель, адъювант, эксципиент или базовый раствор, с которыми вводят агонистические антитела, специфически связывающие CD40. Такие носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, получаемые из нефти, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Например, можно применять 0,4%-ный

солевой раствор и 0,3%-ный раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методов стерилизации (например, фильтрования). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регуляторы pH и буферные агенты, стабилизаторы, загустители, смазывающие и окрашивающие вещества и т.д. Концентрация молекул или антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может широко изменяться, т. е. от менее чем около 0,5 мас.%, обычно по меньшей мере от около 1 до 15 мас.% или 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мас.%, и ее будут прежде всего выбирать на основании требуемой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например человеческий сывороточный альбумин, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing, p. 691-1092, в особенности см. p. 958-989.

Способом введения агонистических антител по изобретению, специфически связывающих человеческий CD40, может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутрисосудное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравaginaльное, ректальное) или другие способы, известные специалистам в данной области и хорошо известные в данной области. Агонистические антитела, специфически связывающие CD40, можно вводить внутриопухолевым путем, в дренирующий участок лимфатического узла для местной доставки в опухоль с применением известных способов.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, можно вводить пациенту посредством любого приемлемого пути, например парентерально посредством внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, или внутрисосудно, или интраперитонеально. Внутривенную инфузию можно проводить в течение периода, составляющего, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, вводимая пациенту, является достаточной для ослабления или по меньшей мере частичного прекращения развития заболевания, лечение которого осуществляется ("терапевтически эффективное количество"), и может иногда составлять от 0,005 до около 100 мг/кг, например от около 0,05 до около 30 мг/кг, или от около 5 до около 25 мг/кг, или около 4, около 8, около 16, или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на учете площади поверхности тела пациента, например 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения острого лейкоза (AL) обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно давать и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение агонистических антител по изобретению, специфически связывающих человеческий CD40, можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, можно вводить в дозе 8 или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг раз в две недели в течение дополнительных 16 недель, с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг раз в четыре недели путем внутривенной инфузии.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода 6 или более месяцев.

Например, агонистические антитела по изобретению, специфично связывающие человеческий CD40, можно вводить в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или, альтернативно, по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч или в любой их комбинации.

Агонистические антитела по изобретению, специфично связывающие человеческий CD40, можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака. Это может быть особенно полезно для пациентов, у которых сложно локализовать опухоль, наличие которой установлено на основании других биологических факторов.

Агонистические антитела по изобретению, специфически связывающие человеческий CD40, могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены перед применением в приемлемом носителе. Было

показано, что этот метод эффективен для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо известные методы лиофилизации и восстановления.

Комбинированные терапии.

В изобретении предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение терапевтически эффективного количества агонистического антитела по изобретению, специфически связывающего человеческий CD40, в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Вторым терапевтическим агентом может быть модулятор иммунной контрольной точки, такой как ингибитор, например антагонистическое антитело, специфически связывающее PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 или TIM-3.

Вторым терапевтическим агентом может также быть агонист активирующей молекулы Т-клеток, например агонистическое антитело, специфически связывающее 4-1BB, CD27, ICOS или OX40.

Второй терапевтический агент может также быть ингибитором фермента индоламин 2,3-дизоксигеназы.

Иллюстративными антителами к PD-1, которые можно применять, являются OPVIDO® (ниволумаб) и KEYTRUDA® (пембролизумаб). Антитело KEYTRUDA® (пембролизумаб) описано, например, в патенте США № 8354509 и содержит VH с SEQ ID NO: 166 и VL с SEQ ID NO: 167. Антитело OPVIDO® (ниволумаб) описано, например, в патенте США № 8008449 (антитело 5C4) и содержит VH с SEQ ID NO: 168 и VL с SEQ ID NO: 169. Аминокислотные последовательности ниволумаба и пембролизумаба также доступны в реестре CAS. Дополнительные антитела к PD-1, которые можно применять, описаны в патенте США № 7332582, патентной публикации США № 2014/0044738, международной патентной публикации № WO 2014/17966 или патентной публикации США № 2014/0356363.

SEQ ID NO: 166

QVQLVQSGVEVKKPGASVKSCKASGYTFNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN

FNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 167

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA

LESGVPARFSGSGGTDFLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 168

QVQLVESGGGVWQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY

YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRADTAVYYCATNDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 169

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATG

IPARFSGSGGTDFLTISSELPEDFAVYYCQSSNWPRTFGGGTKVEIK

Иллюстративными антителами к PD-L1, которые можно применять, являются дурвалумаб, атезолизумаб и авелумаб и те, которые описаны, например, в патентной публикации США № 2009/0055944, патентах США № 8552154, 8217149 и 8779108. Дурвалумаб содержит VH с SEQ ID NO: 170 и VL с SEQ ID NO: 171. Атезолизумаб содержит VH с SEQ ID NO: 172 и VL с SEQ ID NO: 173. Авелумаб содержит VH с SEQ ID NO: 174 и VL с SEQ ID NO: 175.

SEQ ID NO: 170

```

EVQLVESGGG          LVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN
IKQDGESEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
GWFGEIAFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 171
EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQVRSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
DASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLWTFG
QGTKVEIK

SEQ ID NO: 172
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAV
ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRH
WPGGFDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 173
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGAPKLLIYS
ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQ
GTKVEIK

SEQ ID NO: 174
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWRQAPGKGLEWVSS
IYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIK
LGTVTITVDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 175
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM
YDVSNRPSGVSNRFSGSGSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSTYSSTRV
FGTGTKVTVL

```

Второй терапевтический агент может быть любым одним или более из химиотерапевтических лекарственных средств или других противораковых терапевтических средств, известных специалистам в данной области. Химиотерапевтические агенты включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, ингибиторы с действием на микротрубочки, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, ингибиторы ангиогенеза и т.п. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилолмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамидина оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как акламиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзрубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептоницин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-FU; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиандрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон, средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; добавки для восполнения дефицита фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдотраксат; дефофамин; демеколцин; диазиковон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубин; подофилиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теноуазоновую кислоту; триазиковон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; представители семейства таксоидов или таксанов, такие как паклитаксел (ТАКСОЛ® доцетаксел (ТАКСОТЕР®) и их аналоги; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДФМО); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин; ингибиторы рецепторных тирозинкиназ и/или ангиогенеза, включая сорафениб (NEXAVAR®), сунитиниб (SUTENT®), пазопаниб (VOTRIENT™), тоцераниб (PALLADIA™), вандетиниб (ZACTIMA™), цедираниб (RECENTIN®), рего-

рафениб (BAY 73-4506), акситиниб (AG013736), лестауртиниб (CEP-701), эрлотиниб (TARCEVA®), гефитиниб (IRESSA™), BIBW 2992 (TOVOK™), лапатиниб (TYKERB®), нератиниб (HKI-272) и т.п. и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых указанных выше соединений. Также данное определение включает антигормональные агенты, действие которых состоит в регуляции или ингибировании действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленного выше. Другие традиционные химические соединения цитотоксического действия, раскрытые в Wiemann et al., 1985, in Medical Oncology (Calabresi et al, eds.), Chapter 10, McMillan Publishing, также применимы к способам настоящего изобретения.

Иллюстративные агенты, которые можно применять в комбинации с агонистическими антителами изобретения, специфически связывающими CD40, включают ингибиторы тирозинкиназ и нацеленные противораковые терапевтические агенты, такие как Iressa® (гефитиниб) и Tarceva (эрлотиниб), и другие антагонисты HER2, HER3, HER4 или VEGF. Иллюстративные антагонисты HER2 включают CP-724-714, HERCEPTIN™ (трастузумаб), OMNITARG™ (пертузумаб), TAK-165, лапатиниб (ингибитор EGFR и HER2) и GW-282974. Иллюстративные антагонисты HER3 включают антитела к Her3 (см., например, патентную публикацию США № US 2004/0197332). Иллюстративные антагонисты HER4 включают миРНК к HER4 (см., например, Maatta et al., Mol. Biol. Cell, 17:67-79, 2006). Иллюстративным антагонистом VEGF является бевацизумаб (Avastin™).

Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в комбинации с агонистическими антителами изобретения, специфически связывающими CD40, включают стандартные лекарственные препараты для лечения солидных опухолей.

Комбинацию агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, и второго терапевтического агента можно вводить в течение любого удобного временного интервала. Например, агонистическое антитело, специфически связывающее человеческий CD40, и второй терапевтический агент можно вводить субъекту в один и тот же день и даже в одной и той же внутривенной инфузии. Однако агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, и второй терапевтический агент также можно вводить в чередующиеся дни или чередующиеся недели или месяцы и т.д. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, и второй терапевтический агент можно вводить с достаточным приближением по времени, чтобы они одновременно присутствовали (например, в сыворотке крови) в обнаружимых концентрациях у получающего лечение пациента. В некоторых способах полный курс лечения агонистическим антителом изобретения, специфически связывающим человеческий CD40, состоит во введении некоторого количества доз в течение периода времени, за которым следует или которому предшествует курс лечения вторым терапевтическим агентом, состоящий из некоторого количества доз. Можно использовать восстановительный период, составляющий 1, 2 или несколько дней или недель, между введением агонистического антитела изобретения, специфически связывающего человеческий CD40, и второго терапевтического агента.

Агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, или комбинацию антитела изобретения, специфически связывающего CD40, и второго терапевтического агента можно вводить вместе с любой формой радиационной терапии, включающей дистанционную радиационную терапию, модулированную по интенсивности радиационную терапию (IMRT), сфокусированное излучение, а также с любой формой радиационной хирургии, включающей гамма-нож, кибер-нож, Linac и интратканевое облучение (например, имплантированные радиоактивные зерна, баллон GlinSite), и/или хирургическим вмешательством.

Способы сфокусированного излучения, которые можно применять, включают стереотаксическую радиационную хирургию, фракционированную стереотаксическую радиационную хирургию и модулированную по интенсивности радиационную терапию (IMRT). Очевидно, что в стереотаксической радиационной хирургии задействована точная доставка излучения в опухолевую ткань, например опухоль головного мозга, одновременно исключая попадание в окружающую неопухолевую нормальную ткань. Дозу излучения, применяемую в ходе стереотаксической радиационной хирургии, можно изменять, как правило, от 1 до около 30 Гр, и она может охватывать промежуточные диапазоны, включающие, например, дозы от 1 до 5, 10, 15, 20, 25 и до 30 Гр. Поскольку при этом используют неинвазивные фиксирующие устройства, стереотаксическое излучение необязательно доставляют при однократной процедуре. План лечения можно надежным образом повторять ежедневно, что, таким образом, позволяет доставлять множественные фракционированные дозы излучения. При применении для лечения опухоли в течение некоторого времени радиационную хирургию называют "фракционированной стереотаксической радиационной хирургией" или FSR. Напротив, стереотаксическая радиационная хирургия относится к одному сеансу лечения.

Фракционированная стереотаксическая радиационная хирургия может обеспечивать высокий тера-

пептический индекс, т. е. высокую долю уничтожения опухолевых клеток и низкий уровень воздействия на нормальную ткань. Опухоль и нормальная ткань отличным образом отвечают на высокие однократные дозы излучения по сравнению с многократными меньшими дозами излучения. Однократные высокие дозы излучения могут уничтожить больше нормальной ткани, чем несколько меньших доз излучения. Соответственно, многократные меньшие дозы излучения могут уничтожать больше опухолевых клеток, не затрагивая нормальную ткань. Дозу излучения, применяемую в ходе фракционированной стереотаксической радиационной хирургии, можно изменять, как правило, от 1 до около 50 Гр, и она может включать промежуточные диапазоны, например, дозы от 1 до 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 и до 50 Гр в гипофракционированных дозах. Можно также применять модулированную по интенсивности радиационную терапию (IMRT). IMRT представляет собой усовершенствованный режим высокоточной трехмерной конформной радиационной терапии (3DCRT), в котором используют управляемые компьютером линейные ускорители для доставки точных доз излучения к злокачественной опухоли или конкретным областям внутри опухоли, причем профиль каждого луча излучения сформирован в соответствии с профилем мишени, если смотреть со стороны пучка (BEV), с помощью многолепесткового коллиматора (МЛК), создающего таким образом несколько лучей. IMRT позволяет более точно настраивать дозу излучения в соответствии с трехмерной (3D) формой опухоли за счет модуляции интенсивности луча излучения во множестве малых объемов. Соответственно, IMRT позволяет концентрировать более высокие дозы излучения на областях внутри опухоли, сводя к минимуму дозу излучения для окружающих нормальных критических структур. IMRT улучшает возможность приведения в соответствие объема обработки с вогнутыми формами опухоли, например, если опухоль образуется вокруг уязвимой структуры, например спинного мозга, или важного органа, или кровеносного сосуда. Антиидиотипические антитела

В настоящем изобретении предложено антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом изобретения.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 48 и VL с SEQ ID NO: 63.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 49 и VL с SEQ ID NO: 64.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 50 и VL с SEQ ID NO: 64.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 51 и VL с SEQ ID NO: 64.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 52 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 53 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 55 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 55 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 66.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 58 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 68.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 70.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 71.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 57 и VL с SEQ ID NO: 72.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 69.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69.

Антиидиотипическое (Id) антитело представляет собой антитело, распознающее антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или не блокирующим антиген. Блокирующее антиген Id-антитело можно применять для обнаружения свободного антитела в образце (например, описанного в настоящем документе антитела к CD40 изобретения). Неблокирующее Id-антитело можно применять для обнаружения всех антител (свободных, частично связанных

с антигеном или полностью связанных с антигеном) в образце. Id-антитело можно получать путем иммунизации животного антителом, для которого получают анти-Id-антитело.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентично первичному mAb, которое индуцировало анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или дериватизировать любым приемлемым методом.

Иммуноконъюгаты.

Термин "иммуноконъюгат" означает антитело изобретения, конъюгированное с одной или более гетерологичных молекул.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения конъюгировано с одним или более цитотоксическими агентами или визуализирующими агентами.

Иллюстративные цитотоксические агенты включают химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) и радионуклиды.

Цитотоксический агент может представлять собой одно или более лекарственных средств, таких как майтанзиноид (см., например патенты США № 5208020, 541606), ауристатин, например монометилауристатиновые функциональные группы DE и DF (MMAE и MMAF) лекарственных средств (см., например, патенты США № 5635483, 5780588 и 7498298), доластатин, калихеамицин или их производные (см., например, патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 и 5877296; Hinman et al., (1993), Cancer Res. 53:3336-3342 и Lode et al., (1998), Cancer Res. 58:2925-2928); антрациклин, например дауномицин или доксорубицин (см., например, Kratz et al., (2006), Current Med. Chem 13:477-523; Jeffrey et al., (2006), Bioorganic & Med Chem Letters 16:358-362; Torgov et al., (2005), Bioconj. Chem. 16:717-721; Nagy et al., (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:829-834; Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., (2002), J. Med. Chem. 45:4336-4343 и патент США № 6630,579), метотрексат, виндезин, таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел.

Цитотоксический агент может также представлять собой ферментативно активный токсин или его фрагмент, такой как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантины, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

Цитотоксический агент или визуализирующий агент также может представлять собой радионуклид. Иллюстративные радионуклиды включают Ac-225, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, Pb-212 и радиоактивные изотопы Lu. При использовании для обнаружения радиоконъюгата он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например Tc-99m или I-123, или спиновую метку для визуализации с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известна как магнитно-резонансная томография, МРТ), например I-123, I-131, In-111, F-19, C-13, N-15 или O-17.

Конъюгаты антител изобретения и гетерологичных молекул могут быть получены с использованием различных бифункциональных агентов сочетания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HQ), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ригин можно получать, как описано в Vitetta et al., (1987), Science, 238:1098. Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклида с антителом. См., например, WO 94/11026. Линкер может представлять собой "отщепляемый линкер", способствующий высвобождению цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислото-неустойчивый линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотолabile линкер, диметилловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., (1992), Cancer Res. 52:127-131; патент США № 5208020).

Конъюгаты антител изобретения и гетерологичной молекулы можно получать с помощью перекрестно сшивающих реагентов, таких как BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфид-EMCS, сульфид-GMBS, сульфид-KMUS, сульфид-MBS, сульфид-SIAB,

сульфо-SMCC, сульфо- SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые доступны в продаже (например, от компании Pierce Biotechnology, Inc., г. Рокфорд, штат Иллинойс, США).

В изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий антитело изобретения, специфически связывающее CD40 с SEQ ID NO: 75, сшитое с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

Диагностические виды применения и наборы.

В изобретении также предложен набор, содержащий агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения наличия CD40 в биологическом образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит агонистическое антитело изобретения, специфически связывающее человеческий CD40, и реагенты для обнаружения антитела. Набор может включать один или более других элементов, включающих инструкции по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, полезный для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители; и устройства или другие материалы для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело изобретения, находящееся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело C40M67, C40M66, 40M63, C40M62, C40M59, C40M58, C40M56, C40M55, C40M51, C40M18, C40M17, C40M12, C40M102, C40M103, C40M104, C40M105, C40M121 или C40M126.

Способы обнаружения CD40.

В изобретении также предложен способ обнаружения CD40 в образце, включающий получение образца, приведение образца в контакт с антителом изобретения и обнаружение в образце антитела, связанного с CD40.

В некоторых вариантах осуществления образец можно получать из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы крови, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, резецированной хирургическим путем опухолевой ткани, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

Антитела изобретения могут быть обнаружены с использованием известных способов. Иллюстративные способы включают прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Иллюстративными метками и функциональными группами являются рутений, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антитела изобретения можно использовать в ряде анализов для обнаружения CD40 в образце. Иллюстративными анализами являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ЭХЛ) иммуноанализ и иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Настоящее изобретение далее будет описано со ссылкой на приведенные ниже конкретные примеры, не имеющие ограничительного характера.

Пример 1. Материалы и способы.

Создание антигенов, используемых в исследованиях.

Клонирование, экспрессию и очистку антигенов выполняли с использованием стандартных способов. Ниже приведены аминокислотные последовательности используемых белков.

Полноразмерный человеческий CD40 (huCD40); SEQ ID NO: 75

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETEC
 LPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQGTSETDTICTCEEHWHCTSEACESCVLHR
 SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC
 PQDRRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEIFPDDLPGSNTAAPV
 QETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

Внеклеточный домен человеческого CD40 (huCD40-ECD); SEQ ID NO: 76

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECCLPCGESEFLDTWNRETHCHQ
 HKYCDPNLGLRVQQGTSETDTICTCEEHWHCTSEACESCVLHRSCLSPGFGVKQIATGVSDTIC
 EPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRLR

CD40 *Macaca fascicularis* (яванского макака, условно обозначенного в настоящем документе сунго) (сCD40); SEQ ID NO: 77

MVRLPLQCVLWGCLLTAVYPEPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETEC
 LPCSESEFLDTWNRETRCHQHXYCDPNLGLRVQQGTSETDTICTCEEGLHMSSESCSCVPHR
 SCLPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCRPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC
 PQDRQALVVIPIICLGLFVILLVLVFIKKVAKKPNDKAPHPKQEPQEIFLDDLPGSNPAAP
 VQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

Внеклеточный домен CD40 яванского макака (сCD40-ECD); SEQ ID NO: 78

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETEC
 PCSESEFLDTWNRETRCHQHXYCDPNLGLRVQQGTSETDTICTCEEGLHMSSESCSC
 VPHRSCLPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCRPWTSCETKDLVVQQAGTNKTD
 VVCGPQDRQR

Полноразмерный человеческий CD154; SEQ ID NO: 83

MIETYNQTSRPAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNL
 HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETTKENSFEMQKGDQNPQIA
 AHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA
 PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSVSHGT
 GFTSFGLL

Растворимый человеческий CD154; SEQ ID NO: 88

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYI
 YAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGA
 SVFVNVTDPQSVSHGTGFTSFGLLKL

Растворимый CD154 яванского макака (SEQ ID NO: 45)

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYI
 YAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGA
 SVFVNVTDPQSVSHGTGFTSFGLLKL

Анализ связывания в первичных дендритных клетках (ДК) человека и яванского макака.

Человеческие моноциты выделяли из замороженных/свежих РВМС с использованием набора для отрицательного выделения по CD14 в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi). Моноциты яванского макака выделяли из свежих РВМС с использованием набора для положительного выделения по CD14 в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi). Для получения ДК моноциты культивировали в течение 5 дней в полной среде RPMI (Invitrogen) в присутствии 100 нг/мл человеческого GM-CSF и человеческого IL-4 (Peprotech), причем пополнение сред проводили каждые 2 дня. На 5-й день ДК стимулировали с использованием 100 нг/мл липополисахаридов (LPS, Sigma) в течение 24 ч. Затем клетки окрашивали каждым исследуемым антителом к CD40 в различных концентрациях в буферном растворе для проточной цитометрии (фосфатно-солевой буферный раствор (PBS)+1% фетальная бычья сыворотка (FBS); BD Bioscience) в объеме 100 мкл в течение 30 мин на льду с последующим промыванием дважды в проточном буферном растворе. Затем клетки окрашивали в течение дополнительных 30 мин на льду конъюгированным с АПК антителом к человеческому IgG (Jackson ImmunoResearch) в рекомендованном разведении 1: 100 и дважды промывали в проточном буферном растворе. Клетки анализировали на процент положительной и средней интенсивности флуоресценции (СИФ) для определения связывания антитела с использованием системы Fortessa (BD Bioscience).

Анализ связывания в клетках Raji (клеточная линия В-клеточной лимфомы) и клеточной линии HEKCD40.

Клетки Raji получали из ATCC, а клеточную линию HEKCD40 - от компании Invivogen. Клетки культивировали в полной среде RPMI в соответствии с рекомендациями компании. Окрашивание проводили так, как описано выше для анализа связывания в первичных ДК человека и яванского макака.

Анализ активации человеческих ДК и В-клеток.

Получали ДК человека, как описано выше. Человеческие В-клетки выделяли из свежих или замороженных PBMC с использованием набора для отрицательного выделения по В-клеткам в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi). Каждое из антител к CD40 высевали в разных титрах в 96-луночный планшет с U-образным дном, в который добавляли клетки, и инкубировали смесь в течение 15 мин при комнатной температуре. Добавляли либо среду, либо перекрестно сшивающий линкер (антитело к F(ab')₂ в фиксированной концентрации 20 мкг/мл и инкубировали комплекс в инкубаторе при 37°C в течение 24 ч для проведения анализа ДК и в течение 48 ч для проведения анализа В-клеток. В конце временной точки клетки собирали, дважды промывали проточным буферным раствором и инкубировали с человеческим Fc-блоком (Miltenyi) в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим однократным промыванием. Затем клетки окрашивали на маркеры активации CD80, CD83, CD86, HLA-DR и CD23 (BD Bioscience и BioLegend) в течение 30 мин на льду с последующим двукратным промыванием. Клетки анализировали с использованием системы BD Fortessa.

Анализ активации В-клеток яванского макака.

В-клетки яванского макака выделяли из свежих PBMC с использованием набора для положительного выделения по В-клеткам в соответствии с протоколом производителя (MACS Miltenyi). Анализы активации проводили так, как описано выше для ДК и В-клеток человека.

Анализ активации клеток HEK-Blue™ CD40L NF-κB.

Клетки HEK-Blue™ CD40L с гиперэкспрессией CD40 (Invivogen) использовали для оценки способности антител либо к блокированию взаимодействия CD40-CD154, либо к активации CD40. Клеточные линии HEK-Blue™ CD40L стабильно экспрессируют человеческий CD40 и NF-κB-индуцибельную секретрируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP). Активация CD40 на клетках HEK-Blue™ CD40L индуцирует нижележащие события передачи сигнала, приводящие к активации NF-κB и секреции SEAP, которую можно измерить с помощью QUANTI-Blue™ в соответствии с инструкцией производителя. Антитела к CD40 оценивали на их способность либо к блокирующему, либо к агонистическому действию на активацию CD40.

Ингибирование CD40-зависимой активации NF-κB в клеточной линии HEK-Blue CD40L.

Клеточные линии HEK-Blue™ CD40L (Invivogen), которые обрабатывали и поддерживали в соответствии с протоколом поставщика, высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности клеток $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в объеме 100 мкл. Аналитические планшеты покрывали и клетки восстанавливали в течение ночи (37°C, 5% CO₂). На следующий день готовили 4-кратные растворы rhCD154-ECD-His (конечная концентрация 40 нг/мл) и 4-кратные mAb к CD40 или Fab в соответствующих концентрациях (конечная концентрация 1-25 мкг/мл) и добавляли 100 мкл/лунка полученных 2-кратных растворов в 96-луночные аналитические планшеты, содержащие клетки HEK-Blue CD40L™ (конечный объем 200 мкл/лунка). После инкубации в течение 16-24 ч (37°C, 5% CO₂) супернатанты анализировали на активность фосфатазы в 96-луночном аналитическом планшете путем добавления 40 мкл/лунка супернатантов к 160 мкл/лунка подогретого реагента QUANTI-Blue™ (Invivogen), который был приготовлен в соответствии с протоколом поставщика. Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 30-60 мин, после чего определяли оптическую плотность при 650 нм.

CD40-зависимая активация NF-κB в клеточной линии HEK-Blue CD40L NF-κB-SEAP.

Клетки HEK-Blue™ CD40L высевали, как описано выше, и восстанавливали в течение ночи. На следующий день в 96-луночный планшет, содержащий клетки HEK-Blue™ CD40L, добавляли mAb к CD40 в виде 2-кратных растворов (конечный объем 200 мкл/лунка) и инкубировали планшет в течение ночи (37°C, 5% CO₂). Для измерения агонистической активности только антител mAb к CD40 использовали широкий диапазон конечной аналитической концентрации 1-25 мкг/мл. Для определения влияния перекрестного сшивания на агонистическую активность mAb к CD40, 4-кратный раствор антитела и 4-кратный раствор F(ab')₂-фрагмента против Fc-фрагмента антитела hIgG (5-10-кратный избыток относительно mAb) предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего добавляли к клеткам; для получения кривых дозы использовали титрование mAb к CD40, начиная с 1 мкг/мл. После инкубации в течение 16-24 ч (37°C, 5% CO₂) супернатанты анализировали на активность фосфатазы в 96-луночном аналитическом планшете путем добавления 40 мкл/лунка супернатантов к 160 мкл/лунка подогретого реагента QUANTI-Blue™ (Invivogen), который был приготовлен в соответствии с протоколом поставщика. Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 30-60 мин, после чего определяли оптическую плотность при 650 нм.

Пример 2. Выделение антител к CD40 из библиотек фаговых дисплеев.

Выделение антител к CD40 из библиотек фаговых дисплеев.

Связывающие CD40 Fab выбирали из получаемых de novo библиотек рIX-фаговых дисплеев, как описано в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010; международной патентной публикации

№ WO 2009/085462 и патентной публикации США № US 2010/0021477. Вкратце, библиотеки создавали путем диверсификации человеческих каркасов, в которых гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим мини-геном IGHJ-4 посредством петли H3, а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии 012 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с мини-геном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации выбирали положения варьируемых областей легкой и тяжелой цепей возле петель H1, H2, L1, L2 и L3, соответствующие положениям, для которых был выявлен частый контакт с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, встречающимися в каждом из положений в семействах генов зародышевой линии IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию петли H3 создавали, используя синтетические короткие или средние петли длиной 7-14 аминокислот. Распределение аминокислот в H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Конфигурация библиотеки подробно описана в Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010. Каркасы, использованные для создания библиотек, получали наименования в соответствии с их происхождением от человеческого гена зародышевой линии VH и VL. Три библиотеки тяжелых цепей комбинировали с четырьмя зародышевыми легкими цепями или библиотеками диверсифицированных легких цепей, создав 12 уникальных комбинации VH:VL. Позднее эти библиотеки комбинировали, дополнительно основываясь на версиях библиотек для создания дополнительных библиотек для экспериментов по пэннингу на CD40.

Проводили пэннинг библиотек либо против биотинилированного huCD40-ECD, либо против cCD40-ECD, слитого с Fc.

Биотинилированный антиген иммобилизовали на магнитных гранулах, покрытых стрептавидином (Dyna), и подвергали воздействию новых библиотек pIX Fab в конечной концентрации 100 или 10 нМ. Неспецифические фаги отмывали в PBS-Tween и связанные фаги выделяли путем заражения клеток TG1 E.coli. Фаги амплифицировали из этих клеток в течение ночи и повторяли в общей сложности четыре раунда пэннинга. После четырех раундов биопэннинга проводили скрининг моноклональных Fab на связывание с huCD40-ECD и cCD40-ECD, слитого с Fc или His-меткой, в твердофазном ИФА, где Fab иммобилизовали на планшете для ИФА с использованием овечьих антител к Fc человека, затем к иммобилизованным Fab добавляли биотинилированный CD40 с последующим обнаружением антигенов с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). Клоны, демонстрирующие связывание с обоими вариантами CD40, человека и яванского макака, секвенировали по варьируемым областям тяжелой и легкой цепей.

Выбранные клоны подвергали дополнительному созреванию аффинности. Поскольку новые продукты пэннинга были объединены тяжелыми цепями, данные о моноклональном спаривании легких цепей неизвестны. Поэтому созревание аффинности проводили таким образом, что тяжелые цепи из каждого нового продукта отбора были клонированы во всех четырех возможных библиотеках легкой цепи каппа V5.

Область VH каждого нового продукта амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в библиотеках легкой цепи с использованием сайтов рестрикции ферментов XhoI и NcoI. Эти библиотеки были получены на фage M13 и использованы для пэннинга и скрининга, как описано, за исключением уменьшенных концентраций антигена (10, 1, 0,3 нМ) на протяжении трех раундов пэннинга. Кроме того, в третьем раунде перед заражением клеток E.coli проводили длительное промывание в течение одного часа. Моноклональные Fab, полученные в результате проведения созревания аффинности, подвергали скринингу на связывание с обоими вариантами CD40, человека и яванского макака, таким же образом, как при отборе новых продуктов, и те антитела, которые показали перекрестную реактивность, подвергали секвенированию.

Выделение антител к CD40 с использованием крыс, экспрессирующих локусы человеческих иммуноглобулинов.

Антитела к CD40 получали, используя трансгенных крыс, экспрессирующих локусы человеческих иммуноглобулинов, линии OmniRat®; OMT, Inc. Эндогенные локусы иммуноглобулинов в OmniRat® заменены человеческими локусами Igk и Igl, а химерный локус IgH человека/крысы с сегментами V, D и J человеческого происхождения связан с крысиным локусом C_H. Локус IgH содержит 22 человеческих V_H, все человеческие сегменты D и J_H в природной конфигурации связаны с крысиным локусом C_H. Получение и определение характеристик крыс OmniRat® описаны в Osborn, et al. J. Immunol. 190:1481-1490, 2013; и международной патентной публикации № WO 14/093908.

Отдельные когорты из пяти крыс OmniRat иммунизировали рекомбинантными белками CD40 ECD-His человека и CD40 ECD-Fc яванского макака. После 31-34-дневной схемы иммунизации у двух крыс брали лимфоузлы и использовали для создания гибридом. Созданные гибридомы подвергали скринингу на связывание с обоими вариантами CD40-ECD, человека и яванского макака. Гибридомы, показывающие статистически значимое связывание с обоими вариантами CD40-ECD, человека и яванского макака, после проведения одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим примене-

нием апостериорного критерия Даннета для сравнения средних арифметических значений, клонировали и секвенировали их V-области с использованием стандартных методик.

Последовательности, идентифицированные с помощью пэннинга нового фага и иммунизации крыс ОМТ и последующего скрининга супернатантов гибридомы, экспрессировали в виде как mAb, так и Fab и подвергали скринингу на потенциальную антагонистическую активность в анализе активации HEK-Blue™ CD40L NF-κB. Из 18 последовательностей, полученных из нового фага, экспрессированных в виде mAb, были идентифицированы 4 mAb, проявляющие антагонистическую активность, на основании критериев, согласно которым сигнал антагониста будет ниже 3-кратного стандартного отклонения среднего сигнала клеток HEK-Blue™ CD40L, обработанных только rhCD154-ECD-his. На основании аналогичных критериев 15 Fab из 18 соответствующих Fab были идентифицированы как антагонисты. Из 13 полученных из гибридомы последовательностей как антагонисты были идентифицированы 6 mAb и 8 соответствующих Fab. Таким образом, из совокупного количества 31 mAb и соответствующих Fab у 10 mAb и 23 Fab было идентифицировано наличие антагонистической активности.

Описанные выше 31 mAb подвергли скринингу в анализе активации HEK-Blue™ CD40L NF-κB без какого-либо лиганда CD40 для идентификации потенциальных агонистов. Из 18 последовательностей, полученных из нового фага, в качестве агонистов были идентифицированы 16 mAb на основании критериев, согласно которым агонист покажет сигнал, превышающий 3-кратное стандартное отклонение среднего сигнала только клеток HEK-Blue™ CD40L. Из 13 последовательностей из гибридомной библиотеки как агонисты были идентифицированы 8 mAb. Таким образом, из совокупного количества прошедших скрининг 31 mAb как агонисты были идентифицированы 24 mAb.

Пример 3. Антитела к CD40 связываются с CD40 на клетках.

Выбранные антитела, которые блокировали связывание CD154 с CD40, были дополнительно охарактеризованы в отношении их связывания с различными клетками, экспрессирующими CD40.

Эксперименты проводили с использованием описанных выше анализов. 20 антител были дополнительно охарактеризованы в зависимости от их связывания с ДК человека, ДК яванского макака, клетками Raji и клетками HEK-Blue™ CD40L. В табл. 4 показаны значения EC₅₀ для выбранных антител в отношении их связывания с этими клетками и источник антител (фаг или крысы ОМТ).

Таблица 4

Антитело	Источник антитела	EC ₅₀ (мкг/мл)			
		Зрелые ДК человека	Зрелые ДК яванского макака	HEK-Blue™ CD40L	Raji
C40M9	ОМТ	0,1233	0,04507	0,09424	0,05708
C40M12	ОМТ	0,2984	0,04737	0,1124	0,0299
C40M17	ОМТ	0,1274	0,05372	0,07505	0,07394
C40M18	ОМТ	0,352	0,03895	0,1262	0,07298
C40M51	Фаг	0,4783	0,05439	0,128	0,04337
C40M55	Фаг	0,1025	0,02182	0,06306	0,04615
C40M56	Фаг	0,402	0,05652	0,1089	0,09496
C40M58	Фаг	0,7238	0,07072	0,1458	0,06109
C40M59	Фаг	0,8261	0,07404	0,3536	0,1247
C40M62	Фаг	0,3288	0,07157	0,2276	0,0994
C40M63	Фаг	0,09962	0,03095	0,0849	0,03957
C40M66	Фаг	0,2024	0,04826	0,1688	0,07303
C40M67	Фаг	0,7658	0,3269	0,5497	0,2474

Пример 4. Определение характеристик антител к CD40.

Выбранные антитела анализировали на их способность к активации первичных человеческих дендритных клеток и В-клеток зависимым от перекрестного сшивания образом, используя описанные выше анализы, в присутствии или в отсутствие перекрестно сшивающего линкера (антитела к F(ab')₂ человека). На фиг. 1 показано, что выбранные антитела были способны активировать В-клетки только в присутствии перекрестно сшивающего агента при оценке активации В-клеток на основании индукции поверхностной экспрессии CD23 (фиг. 1A и 1B) или индукции поверхностной экспрессии HLA-DR (фиг. 1C и 1D). На фиг. 2 показано, что выбранные антитела были способны активировать ДК только в присутствии перекрестно сшивающего линкера при оценке активации ДК на основании индукции поверхностной экспрессии CD83 (фиг. 2A и 2B) или индукции поверхностной экспрессии HLA-DR (фиг. 2C и 2D). Контрольное антитело, используемое в анализах, индуцирует активацию В-клеток и ДК независимым от перекрестного сшивания образом (CP-870,893).

Значения EC₅₀ измеряли для каждого исследуемого антитела в отношении индукции поверхностной экспрессии маркеров активации ДК CD80, CD83, CD86 и HLA-DR и маркеров активации В-клеток CD23, CD80, CD83, CD86 и HLA-DR. Антитела, которые при перекрестном сшивании индуцировали поверхностную экспрессию всех исследованных маркеров ДК и В-клеток, классифицировали как агонисты. В

табл. 5 показаны значения EC_{50} выбранных антител в отношении индукции ими поверхностной экспрессии маркеров активации В-клеток. В табл. 6 показаны значения EC_{50} выбранных антител в отношении индукции ими поверхностной экспрессии маркеров активации ДК.

Таблица 5

Антитело	В-клетки; EC_{50} (мкг/мл)				
	CD23	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
C40M9	0,002873	0,01309	0,000006678	0,00001087	0,00001196
C40M11	3,132	0,9204	0,0208	0,01229	0,01573
C40M12	125,4	0,00623	0,002844	0,002279	0,004273
C40M17	0,001948	0,0008786	0,0008382	0,004572	0,001569
C40M18	0,3062	0,04806	0,06239	0,008725	0,02386
C40M50	1,704	2,034	1,574	1,991	1,741
C40M51	0,04479	0,01831	0,02592	0,01318	0,007773
C40M52	1,334	0,03019	1,481	0,007082	0,06682
C40M53	0,02243	0,04693	2,247	0,006516	0,001178
C40M55	0,06162	0,001433	0,001252	0,0006455	0,0004372
C40M56	0,01856	0,001414	0,001717	0,001194	0,001054
C40M57	0,01587	0,001718	0,002085	0,002345	0,001641
C40M58	0,06	0,02164	0,007851	0,002352	0,004678
C40M59	1,236	0,01056	0,01077	0,0154	0,004836
C40M60	0,02046	0,01714	0,001706	0,001733	0,001091
C40M61	0,02809	0,0224	0,004731	0,006599	0,004719
C40M62	0,01253	0,001543	0,001256	0,001135	0,0003556
C40M63	0,006942	0,00001668	0,0005813	0,00126	0,000009663
C40M66	0,04141	0,005115	0,001818	0,002464	0,001077
C40M67	0,004169	0,003323	0,001463	0,002257	0,000792
Эталонное mAb*	0,003172	0,007337	0,004283	0,004042	0,008147
* Без перекрестносшивающего линкера					

Таблица 6

Антитело	ДК, EC_{50} (мкг/мл)			
	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
C40M9	0,02769	0,03985	0,1033	0,07974
C40M11	0,06097	0,312	0,1448	0,2191
C40M12	0,000003935	0,3324	0,5025	0,3006
C40M17	0,03602	0,3064	0,03296	1,724E-07
C40M18	0,05226	0,04784	0,03021	0,01047
C40M50	0,4765	0,5989	0,0001058	0,00004135
C40M51	0,9675	0,04604	0,1281	0,05242
C40M52	4,207E-11	0,1138	0,9492	0,128
C40M53	1,276	0,03104	0,2996	0,04803
C40M55	0,0616	0,1031	0,1981	0,08108
C40M56	0,05173	0,1068	0,1321	0,06845
C40M57	0,1176	0,04141	0,1284	0,05546
C40M58	0,05236	0,1212	0,1149	0,000004067
C40M59	0,000342	0,2755	0,009793	0,05356
C40M60	0,00001139	0,01384	0,04959	0,004906
C40M61	0,00001339	0,02433	0,02089	0,001154
C40M62	0,6015	0,2184	0,3811	0,06035
C40M63	0,07054	0,0009615	0,2583	0,1542
C40M66	0,1582	0,1746	0,4233	0,03937
C40M67	0,04994	0,127	0,2015	0,05067
Эталонное mAb	0,04466	0,2454	0,133	0,2417
* Без перекрестносшивающего линкера				

Полученные антитела сравнивали с эталонным антителом CP-870,893 в отношении способности индуцировать активацию ДК с помощью четырех поверхностных маркеров ДК. Несколько антител индуцировали поверхностную экспрессию по меньшей мере одного маркера активации ДК (CD80, CD83, CD86, HLA-DR) при сопоставимом или более низком значении EC_{50} по сравнению со значением для эталонного антитела. В анализах полученные антитела к CD40 оценивали в присутствии перекрестно сшивающего агента, тогда как эталонное антитело оценивали в отсутствие перекрестно сшивающего агента.

Антитела C40M9 и C40M48 более эффективно индуцировали поверхностную экспрессию всех маркеров активации ДК, оценку которых проводили при сравнении с эталонным антителом.

Антитела C40M18, C40M55 и C40M63 более эффективно индуцировали поверхностную экспрессию трех маркеров активации ДК, оценку которых проводили при сравнении с эталонным антителом.

Антитела C40M17, C40M51 и C40M56 более эффективно индуцировали поверхностную экспрессию двух маркеров активации ДК, оценку которых проводили при сравнении с эталонным антителом.

Антитела C40M12, C40M62 и C40M66 более эффективно индуцировали поверхностную экспрессию одного маркера активации ДК, оценку которого проводили при сравнении с эталонным антителом.

Экспериментальные данные показывают, что несколько полученных агонистических антител к CD40 были более эффективными в отношении способности активировать дендритные клетки, чем эталонное антитело. Важно отметить, что, поскольку созданные антитела не могли активировать ДК или В-клетки без перекрестного сшивания, ожидают, что они будут иметь полезный профиль безопасности по сравнению с эталонным антителом.

Пример 5. Определение структурных характеристик антител к CD40.

Выделение антитела и секвенирование полипептидных цепей проводили стандартными методами.

Аминокислотные последовательности HCDR1 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 7.

Аминокислотные последовательности HCDR2 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 8.

Аминокислотные последовательности HCDR3 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 9.

Аминокислотные последовательности LCDR1 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 10.

Аминокислотные последовательности LCDR2 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 11.

Аминокислотные последовательности LCDR3 выбранных антител к CD40 показаны в табл. 12.

Аминокислотные последовательности VH выбранных антител к CD40 показаны в табл. 13.

Аминокислотные последовательности VL выбранных антител к CD40 показаны в табл. 14.

ДНК-последовательности VH выбранных антител к CD40 показаны в табл. 15.

ДНК-последовательности VL выбранных антител к CD40 показаны в табл. 16.

Аминокислотные последовательности тяжелых цепей выбранных антител к CD40 показаны в табл. 17.

ДНК-последовательности тяжелых цепей выбранных антител к CD40 показаны в табл. 18.

Аминокислотные последовательности легких цепей выбранных антител к CD40 показаны в табл. 19.

ДНК-последовательности легких цепей выбранных антител к CD40 показаны в табл. 20.

Таблица 7

mAb	HCDR1							
	Последовательность							SEQ ID NO:
C40M67	D	Y	A	M	N			1
C40M66	S	Y	A	I	S			2
C40M63	S	Y	A	I	S			2
C40M62	S	Y	A	I	S			2
C40M59	S	Y	W	I	S			3
C40M58	S	Y	A	M	S			4
C40M56	S	Y	A	M	S			4
C40M55	S	Y	A	I	S			2
C40M51	S	Y	A	M	S			4
C40M18	S	Y	A	M	S			4
C40M17	S	Y	A	M	S			4
C40M12	S	Y	A	M	S			4
C40M9	S	S	S	Y	Y	W	G	5
C40M102	S	Y	A	M	S			4
C40M103	S	Y	A	M	S			4
C40M104	S	Y	A	M	S			4
C40M105	S	S	S	Y	Y	W	G	5
C40M121	S	S	S	Y	Y	W	G	5
C40M126	S	S	S	Y	Y	W	G	5

Таблица 8

mAb	HCDR2																	SEQ ID NO:
	Последовательность																	
C40M67	G	I	K	S	G	G	S	S	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	8
C40M66	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	7
C40M63	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	7
C40M62	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	7
C40M59	Y	I	I	P	I	S	G	T	A	R	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
C40M58	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	6
C40M56	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	6
C40M55	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	7
C40M51	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	6
C40M18	I	I	N	N	N	V	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	9
C40M17	T	I	N	N	S	G	G	G	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	11
C40M12	V	I	S	D	S	G	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	12
C40M9	N	I	Y	Y	R	G	D	T	Y	Y	S	P	S	L	K	S		10
C40M102	I	I	N	N	N	V	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	9
C40M103	I	I	N	N	N	V	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	9
C40M104	I	I	N	N	N	V	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	9
C40M105	N	I	Y	Y	R	G	D	T	Y	Y	S	P	S	L	K	S		10
C40M121	N	I	Y	Y	R	G	D	T	Y	Y	S	P	S	L	K	S		10
C40M126	N	I	Y	Y	R	G	D	T	Y	Y	S	P	S	L	K	S		10

Таблица 9

mAb	HCDR3															SEQ ID NO:
	Последовательность															
C40M67	H	V	D	F	Y	R	A	L	D	Y						22
C40M66	V	R	Y	S	A	W	Y	R	D	S	L	D	Y			25
C40M63	V	G	H	P	A	W	W	R	D	S	L	D	Y			24
C40M62	V	A	N	A	A	Y	F	R	S	G	L	D	Y			23
C40M59	E	P	G	Y	S	S	G	L	S	V	D	Y	F	D	Y	17
C40M58	G	P	A	Y	T	I	V	F	D	Y						19
C40M56	G	P	V	Y	S	L	V	F	D	Y						20
C40M55	D	G	Y	R	R	Y	G	I	G	R	Y	G	F	D	Y	14
C40M51	G	P	V	Y	S	S	V	F	D	Y						21
C40M18	E	G	G	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V				15
C40M17	E	G	G	K	Y	Y	Y	Y	A	M	D	V				16
C40M12	E	G	G	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V				15
C40M9	G	F	R	F	D	Y										18
C40M102	E	G	G	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V				15
C40M103	E	G	G	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V				15
C40M104	E	G	G	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V				15
C40M105	G	F	R	F	D	Y										18
C40M121	G	F	R	F	D	Y										18
C40M126	G	F	R	F	D	Y										18

Таблица 10

mAb	LCDR1															
	Последовательность															SEQ ID NO:
C40M67	R	A	S	Q	S	V	K	N	S	S	L	A				28
C40M66	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	26
C40M63	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	26
C40M62	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	26
C40M59	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N					27
C40M58	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N					27
C40M56	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N					27
C40M55	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N					27
C40M51	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	N					27
C40M18	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	V	C					30
C40M17	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	A	C					29
C40M12	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	V	C					30
C40M9	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S		32
C40M102	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	V	C					30
C40M103	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	V	S					31
C40M104	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	V	S					31
C40M105	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S		32
C40M121	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S		32
C40M126	T	G	T	S	S	D	V	G	G	Y	N	Y	V	S		32

Таблица 11

mAb	LCDR2						
	Последовательность						SEQ ID NO:
C40M67	T	A	S	S	R	A	38
C40M66	W	A	S	T	R	E	39
C40M63	W	A	S	T	R	E	39
C40M62	W	A	S	T	R	E	39
C40M59	A	A	S	S	L	Q	33
C40M58	A	A	S	S	L	Q	33
C40M56	A	A	S	S	L	Q	33
C40M55	A	A	S	S	L	Q	33
C40M51	A	A	S	S	L	Q	33
C40M18	Q	D	S	K	R	P	36
C40M17	Q	D	S	R	R	P	37
C40M12	H	D	N	K	R	P	35
C40M9	E	V	S	K	R	P	34
C40M102	Q	D	S	K	R	P	36
C40M103	Q	D	S	K	R	P	36
C40M104	Q	D	S	K	R	P	36
C40M105	E	V	S	K	R	P	34
C40M121	E	V	S	K	R	P	34
C40M126	E	V	S	K	R	P	34

Таблица 12

mAb	LCDR3										SEQ ID NO:
	Последовательность										
C40M67	Q	Q	S	S	A	P	P	W	T		42
C40M66	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	T		44
C40M63	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	T		44
C40M62	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	T		44
C40M59	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T		43
C40M58	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T		43
C40M56	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T		43
C40M55	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T		43
C40M51	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T		43
C40M18	Q	A	W	V	S	S	T	V	V		41
C40M17	Q	A	W	A	S	S	T	V	V		40
C40M12	Q	V	W	D	S	S	T	V	V		46
C40M9	S	S	Y	A	G	S	N	N	L	V	47
C40M102	Q	A	W	V	S	S	T	V	V		41
C40M103	Q	A	W	V	S	S	T	V	V		41
C40M104	Q	A	W	V	S	S	T	V	V		41
C40M105	S	S	Y	A	G	S	N	N	L	V	47
C40M121	S	S	Y	A	G	S	N	N	L	V	47
C40M121	S	S	Y	A	G	S	N	N	L	V	47

Таблица 13

mAb	VH	Последовательность VH	VH с SEQ ID NO:
C40M67	C40H20	EVQLLES G GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWRQ APGKGLEWVSGIKSGGSSKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHVDFYRALDYWGQGT LVTV SS	48
C40M66	C40H21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARVRYSAWYRDSL DYWGQGT L VTVSS	49
C40M63	C40H25	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARVGHPAWWRDSL DYWGQGT L VTVSS	50
C40M62	C40H26	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARVANAAYFRSGLDYWGQGT L VTVSS	51
C40M59	C40H29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYWISWVRQ APGQGLEWMGYIIPISGTARYAQKFQGRVTITADESTST	52

		AYMELSSLRSED TAVYYCAREPGYSSGLSVDYFDYWGQG TLVTVSS	
C40M58	C40H30	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPAYTIVFDYWGQGLVTV SS	53
C40M56	C40H32	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPVYSLVFDYWGQGLVTV SS	54
C40M55	C40H33	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCARDGYRRYGIGRYGFDYWGQG TLVTVSS	55
C40M51	C40H38	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPVYSSVFDYWGQGLVTV SS	56
C40M18	C40H48	EVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSIINN NVGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY YYYGMDVWGQGT TV TVSS	57
C40M17	C40H46	EVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGRGLEWVSTINNSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLHMNSLRAEDTAVYYCAKEGGKY YYYAMDVWGQGT TV TVSS	58
C40M12	C40H45	EVQLVES GCGGLVQPGCSLRLSCAASCFTFC SYAMSWVRQ APGKGLEWVSVISDSGGRTYYADSVKGRFTISR DY SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY YYYGMDVWGQGT TV TVSS	59
C40M9	C40H43	QLQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVD TSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCAKGFRFDYWGQGLVTVSS	60
C40M102	C40H48	EVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSIINN NVGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY YYYGMDVWGQGT TV TVSS	57
C40M103	C40H48	EVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSIINN NVGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY YYYGMDVWGQGT TV TVSS	57
C40M104	C40H48	EVQLVES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSIINN NVGRITYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDY YYYGMDVWGQGT TV TVSS	57
C40M105	C40H52	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVD TSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARGFRFDYWGQGLVTVSS	61
C40M121	C40H53	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVD TSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFDYWGQGLVTVSS	62
C40M126	C40H53	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVD TSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFDYWGQGLVTVSS	62
		RQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVD TSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCAKGFRFDYWGQGLVTVSS	

Таблица 14

mAb	VL	Последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
C40M67	C40L10	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVKNSSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSAPPWTFGQGTKVEIK	63
C40M66	PH9L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	64
C40M63	PH9L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	64
C40M62	PH9L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	64
C40M59	PH9L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	65
C40M58	PH9L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	65
C40M56	PH9L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	65
C40M55	PH9L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	65
C40M51	PH9L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	65
C40M18	C40L64	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAAWVSSTVVFGGGTKLTVL	66
C40M17	C40L63	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSRRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAAWASSTVVFGGGTKLTVL	67
C40M12	C40L62	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVIYHDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAQVWSSSTVVFGGGTKLTVL	68
C40M9	BCML12	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSLYAGSNNLVFGGGTKLTVL	69
C40M102	C40L70	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAAWVSSSTVVFGGGTKLTVL	70
C40M103	C40L69	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAAWVSSSTVVFGGGTKLTVL	71
C40M104	C40L68	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCAAWVSSSTVVFGGGTKLTVL	72
C40M105	BCML12	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSLYAGSNNLVFGGGTKLTVL	69
C40M121	BCML12	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSLYAGSNNLVFGGGTKLTVL	69
C40M126	BCML12	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSLYAGSNNLVFGGGTKLTVL	69

Таблица 15

mAb	ДНК VH	ДНК VH с SEQ ID NO:
C40M67	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCG GCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCGA CTATGCGATGAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAA TGGGTGAGCGGGATCAAGAGCGGCGGTAGCTCCAAATATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACAGCAAAAA CACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGAAACACGTTGACTTTTATAGGGCCTTGGA ATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC	89
C40M66	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCA GCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAG CTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAA TGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAACTATGCGC AGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATTAACGCGGATGAAAGCACCAG CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGTTTCGGTATTTCGGCGTGATAGGGACT CTTTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT	90
C40M63	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCA GCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAG CTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAA TGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAACTATGCGC AGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATTAACGCGGATGAAAGCACCAG CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGTAGGCCATCCGGCTTGGTGGCGTGATT CGTTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC	91
C40M62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCA GCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAG CTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAA TGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAACTATGCGC AGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATTAACGCGGATGAAAGCACCAG CACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGTTGCCAACGCTGCGTATTTAGGTCTG GCTTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC	92
C40M59	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCA GCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTC CTACTGGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAA TGGATGGGCTACATTATTCCGATCAGTGGCACTGCCCGCTACGCGC AGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATTAACGCGTATGAAAGCACCAG	93

	CACCGCGTATATGGAACGTAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAACCAGGCTACAGTAGTGGCCTGAGCGTTGACTACTTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT	
C40M58	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGCGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAA TGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAAAA CACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGGTCCAGCATACACTATCGTTTTTTGATT ATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT	94
C40M56	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGCGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAA TGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAAAA CACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGGTCTGTTTTATTCTCTGTTTTTGACT ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT	95
C40M55	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCA GCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCAG CTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAA TGGATGGGCGGCATTATTCCGATTTTTTGGCACCGCTAACTACGCGC AGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATACCGCTGATGAAAGCACAGC CACCGCGTATATGGAACGTAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGATGGTTATCGGCGGTATGGCATCGGTC GTTACGGTTTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTC GAGT	96
C40M51	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGCGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAA TGGGTGAGCGCGATCAGCGGCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGG ATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAAAA CACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGGCCAGTTTATTCTAGCGTTTTTCGACT ATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT	97
C40M18	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAA TGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGGCCGAGCTACTACGCCG ACAGCGTGAAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTCTATCT	98
C40M17	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAGAGGACTCGAG TGGGTGTCCACCATCAACAACAGCGGCGGAGGCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCAAGTACTACTACTATGCCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACAGTGTCTATCT	99

C40M12	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCGGCAG CTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAA TGGGTGTCCGTGATCAGCGACAGCGGCGGACAGAACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACTACAGCAAGAA CACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCT	100
C40M9	CAGCTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCG AGATCCTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGACGATCAGCAG CAGCTCTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGGGA CTGGAATGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACA GCCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA GAACCAAGTTCTCCCTGAAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGCTTCAGATTTCGATTACTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTACCGTGTCTATCT	101
C40M102	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAA TGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCGGACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCT	98
C40M103	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAA TGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCGGACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCT	98
C40M104	GAGGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAA TGGGTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCGGACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA CACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCA TGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCT	98
C40M105	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGCTGGTGAAGCCCAGCG AGACCCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGACGATCAGCAG CAGCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACA GCCCCAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA GAACCAAGTTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCCGGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC	102
C40M121	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGCTGGTGAAGCCCAGCG AGACCCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGACGATCAGCAG CAGCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACA GCCCCAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA	103
	GAACCAAGTTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC	
C40M126	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGCTGGTGAAGCCCAGCG AGACCCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGACGATCAGCAG CAGCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGC CTGGAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACA GCCCCAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAA GAACCAAGTTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCGGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCC AGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC	103

Таблица 16

mAb	ДНК VL	ДНК VL с SEQ ID NO:
C40M67	GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTGAGCCGGG GCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAAAAA TAGCAGTCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGC CTGCTGATTTATACTGCGAGCAGCCGCGGACCGGCATTCCGGATC GCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAG CCGCTTGAACCGGAAGATTTTTCGGGTGTATTATTGCCAGCAGTCC TCCGCACCTCCGTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTA AA	104
C40M66	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGG GCGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTA CAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGA GCGGCGTGCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT CACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTAC TACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAGATCAAG	105
C40M63	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGG GCGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTA CAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGA GCGGCGTGCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT CACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTAC TACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAGATCAAG	105
C40M62	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGG GCGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTA CAGCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGA GCGGCGTGCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT CACCTTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTAC TACTGCCAGCAGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAGATCAAG	105
C40M59	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAG CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAG	106

	CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTAC AGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAG	
C40M58	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAG CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTAC AGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAG	106
C40M56	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAG CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTAC AGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAG	106
C40M55	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAG CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTAC AGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAG	106
C40M51	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG GCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAG CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAG CCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTAC AGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAGATCAAG	106
C40M18	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCC AGACCGCCAGCATCACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATA CGTGTGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGGTGGTC ATCTACCAGGACAGCAAGAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCCTACTACTGTCAGGCTTGGGTGTCC AGCACCGTGGTGTGTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG	107
C40M17	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCC AGACCGCCAGCATCACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGATAAGTA CGCCTGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTC ATCTACCAGGACAGCAGAAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCGATTACTATTGTCAGGCCTGGGCCAGC AGCACCGTGGTGTGTTGGCGGCGGAACAAAGCTGACCGTGCTG	108
C40M12	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCC AGACCGCCAGCATCATCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATA CGTGTGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGGTGGTC ATCTACCACGACAACAAGAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGTCTGGGACAGC AGCACCGTGGTGTGTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG	109
C40M9	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCC AGAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGG	110

	CTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCT AAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAG ATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGT GTCTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGC TACGCCGGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CCGTGCTG	
C40M102	AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCC AGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTA CGTGTGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTG ATCTACCAGGACAGCAAGCGGCCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGC AGCACCGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG	111
C40M103	AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCC AGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTA CGTGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTG ATCTACCAGGACAGCAAGCGGCCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGC AGCACCGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG	112
C40M104	AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCC AGACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTA CGTGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTG ATCTACCAGGACAGCAAGCGGCCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTCA GCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCAC CCAGGCCATGGACGAGGCCCTACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGC AGCACCGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTG	113
C40M105	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCC AGAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGG CTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCT AAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAG ATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGT GTCTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGC TACGCCGGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CCGTGCTG	110
C40M121	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCC AGAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGG CTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCT AAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAG ATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGT GTCTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGC TACGCCGGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CCGTGCTG	110
C40M126	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCC AGAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGG CTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCT AAGCTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAG ATAGATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGT GTCTGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGC TACGCCGGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CCGTGCTG	110

Таблица 17

mAb	Аминокислота HC	SEQ ID NO тяжелой цепи:
C40M67	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMNWVRQAPGKGL EWVSGIKSGGSSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKHVDFYRALDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	114
C40M66	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVRYSAWYRDSLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	115
C40M63	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVGHPAWWRDSLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	116
C40M62	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVANAAAYFRGLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	117
C40M59	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYISWVRQAPGQGL EWMGYIIPISGTARYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREPGYSSGLSDYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	118

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	
C40M58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGPAYTIVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	119
C40M56	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGPVYSLVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	120
C40M55	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGYRRYGIGRYGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	121
C40M51	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGPVYSSVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	122
C40M18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSIINNNVGRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKEGGDYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE	123

	EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
C40M17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGRGLEWVSTINSSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCAKEGGKYYYYAMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	124
C40M12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIDSGGRTTYADSVKGRFTISR DYSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	125
C40M9	QLQLQESGPGLVKPKSEILSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGKGLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAA DTAVYYCAKGFREFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	126
C40M102	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	123
C40M103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSIINNNVGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEGGDYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ	123

	DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	
C40M104	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSIINNNGVGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKEGGDYGGYMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	123
C40M105	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGK GLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGFRFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	127
C40M121	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGK GLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAKGRFRFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	128
C40M126	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGK GLEWIGNIYYRGDTYYSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCAKGRFRFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	129

Таблица 18

mAb	ДНК НС	ДНК тяжелой цепи с SEQ ID NO:
C40M67	GAAGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCGG	140
	CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCGACT ATGCGATGAACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGCCTGGAATGG GTGAGCGGGATCAAGAGCGGCGGTAGCTCCAAATATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGCTTTACCATTAGCCGCGATAACAGCAAAAACACCC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGAAACACGTTGACTTTTATAGGGCCTTGGAATATTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGGAACCTAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC CGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGAGGTTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCC CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA CTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M66	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAG CAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCT ATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCGCAGGCGCTGGAATGG ATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAACTATGCGCAGAA ATTTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCG CGTATATGGAACCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGGCTTCGGTATTTCGGCGTGGTATAGGGAATCTTTGGA CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGAGTGGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC	141

	GGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M63	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAG CAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCT ATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAAGTATGCGCAGAA ATTTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCG CGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCGTAGGCCATCCGGCTTGGTGGCGTGATTCTGTTGGA CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTG ACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGTCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCC TGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	142
C40M62	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAG CAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCT ATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCGAAGTATGCGCAGAA ATTTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCG CGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCGTTGCCAACGCTGCGTATTTAGGTCTGGCTTGGA CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTG ACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGTCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCC	143

	TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M59	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAG CAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTCCT ACTGGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCTACATTATTCGGATCAGTGGCACTGCCCCGTACGCGCAGAA ATTTCAAGGGCCGCTGACCATTACCGCTGATGAAAGCACCAGCACCG CGTATATGGAACAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCAACCAGGCTACAGTAGTGGCCTGAGCGTTGACTA CTTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCTTGGTGACAGTCTCGAGTGCCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCAGCACCTGAACTCTTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGACCCTGAGGTCAAGTTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	144
C40M58	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAGCCGGGCGG CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGAGCGCGATCAGCGGCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAAAACACCC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGGCTCCAGCATACACTATCGTTTTTTGATTATTGGGG CCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA	145

	CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M56	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGCGCGCGCTGGTGCAGCCGGGCGG CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGAGCGCGATCAGCGGCTCCCGTGGCTCCACATATTATGCGGATAG CGTGAAGGCCGCTTTACCATTTCACGAGATAACAGCAAAAACACCC TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCGGTCTCTGTTTATTCTCTGGTTTTTGACTACTGGGG CCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	146
C40M55	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAG CAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCT ATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGG ATGGGCGGCATTATTCCGATTTTGGCACCGCTAACTACGCGCAGAA ATTTAGGGCCGCGTGACCATTACCGCTGATGAAAGCACCAGCACCG CGTATATGGAACAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCATGGTTATCGGCGGTATGGCATCGGTGTTACGG TTTCGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT	147

	CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCCCAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M51	GAAGTGCAGCTGCTGGAAGCGGCGCGGCGCTGGTGCAGCCGGGCGG CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCT ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGG GTGAGCGGATCAGCGGCTCCGGTGGCTCCACATATTATGCGGATAG CGTGAAAGGCCGCTTTACCATTTACGAGATAACAGCAAAAACACCC TGATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCGGCCAGTTTATTCTAGCGTTTTCGACTATTGGGG CCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAA CTCTTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGAC GCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	148
C40M18	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCGAGCGGCTTACCTTCAGCAGCT ACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGG GTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCCGGACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC	149

	TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M17	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCT ACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTTGGCAGAGGACTCGAGTGG GTGTCCACCATCAACAACAGCGGCGGAGGCACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCACATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGAGGGCGGCAAGTACTACTACTATGCCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	150

C40M12	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGCTTCACCTTCGGCAGCT ACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGG GTGTCCGTGATCAGCGACAGCGGCGGCAGAACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACTACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATGTGCCAAAGAGGGCGGCATTACTACTACTACGGCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	151
C40M9	CAGCTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCGA GATCCTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCA GCTCTTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGGGACTG GAATGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCC CAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACC AGTTCTCCCTGAAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAAGGGCTTCAGATTTCGATTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTCAACGTGTATCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC	152

	GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M102	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCT ACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTTGGCAAGGGACTGGAATGG GTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCCGGACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACAGCGTCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCAGCCCCCATCGACAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	149
C40M103	GAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCT ACGCTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCTTGGCAAGGGACTGGAATGG GTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCCGGACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGAGGGCGGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA	149

	GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M104	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGG CAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCT ACGTATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGG GTGTCCATCATCAACAACAACGTGGGCGCGACCTACTACGCCGACAG CGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TATTGTGCCAAAGAGGGCGCGATTACTACTACTACGGCATGGACGT GTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCTATCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	149
C40M105	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCAGCGA GACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCAGCA GCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGCCTG GAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGCGACACCTACTACAGCCC CAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGACACACGCAAGAACC AGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCCGGGGCTTCCGGTTGCGACTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCTTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG	153

	ACAAAACACACATGCCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC CACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
C40M121	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGCCCCCGCCTGGTGAAGCCCAGCGA GACCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGCGGGCAGCATCAGCAGCA GCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGCCTG GAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCC CAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACC AGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTG ACAAAACACACATGCCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC CACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	154
C40M126	CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGCCCCCGCCTGGTGAAGCCCAGCGA GACCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCGCGGGCAGCATCAGCAGCA GCAGCTACTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGGCAAGGGCCTG GAGTGGATCGGCAACATCTACTACCGGGGCGACACCTACTACAGCCC CAGCCTGAAGAGCCGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACC AGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCAAGGGCTTCCGGTTCGACTACTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG	155

GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCC TACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGGAGC ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTACGCTGACCTGCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGAC CACGCTCCCGTGTGGTGGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Таблица 19

mAb	Аминокислота LC	SEQ ID NO легкой цепи:
C40M67	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVKNSSLAWYQQKPGQAPRL LIYTASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSA PPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	130
C40M66	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	131
C40M63	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	131
C40M62	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQYYSTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	131
C40M59	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	132
C40M58	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST	132

	PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
C40M56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	132
C40M55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	132
C40M51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	132
C40M18	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVI YQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCQAWVSST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	133
C40M17	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVI YQDSRRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWASST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	134
C40M12	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVI YHDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDSST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	135
C40M9	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYA GSNNLVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	136
C40M102	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVLVI YQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWVSST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	137
C40M103	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVLVI YQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWVSST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	138
C40M104	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVVI YQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYCQAWVSST VVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	139
C40M105	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYA GSNNLVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	136
C40M121	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYA GSNNLVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	136
C40M126	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK LMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYA GSNNLVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	136

Таблица 20

mAb	ДНК LC	ДНК легкой цепи с SEQ ID NO:
C40M67	GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCCTGAGCCCGGG CGAACGCGCGACCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAAAAATA GCAGTCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTG CTGATTTATACTGCGAGCAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTT TAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCCGCC TGGAACCGGAAGATTTTGGGTGTATTATTGCCAGCAGTCCTCCGCA CCTCCGTGGACTTTTGGCCAGGGCACAAAGTGGAAATTAAACGTAC GGTGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	156
C40M66	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGG CGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACA GCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGC CAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGG CGTGCCCGACCGGTTGAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCC TGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGC CAGCAGTACTACAGCACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGT GGAGATCAAGCGGACCGTGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCC CCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GC	157
C40M63	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGG CGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACA	157

	GCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGC CAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGG CGTGCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCC TGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGC CAGCAGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGT GGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCC CCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GC	
C40M62	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGG CGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACA GCAGCAACAACAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGC CAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGGAGAGCGG CGTGCCCGACCGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCC TGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGC CAGCAGTACTACAGCACCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGT GGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCC CCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGA CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GC	157
C40M59	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG CGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCT ACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTCAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCC CCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCC CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	158
C40M58	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG CGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCT ACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTCAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGC AGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCC CCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCC CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	158

	ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	
C40M56	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG CGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCT ACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGC AGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACC CCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCC CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	158
C40M55	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG CGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCT ACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGC AGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACC CCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCC CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	158
C40M51	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG CGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCT ACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTCAG CGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGC AGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACC CCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGAACCGCAAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCC CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGG CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCTTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	158
C40M18	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCCA GACCGCCAGCATCACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACG TGTGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGGTGGTTCATC TACCAGGACAGCAAGAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTGAGCGG CAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG CCATGGACGAGGCTACTACTACTGCCAGGCTTGGGTGTCCAGCACC GTGGTGTGTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTC	159

	AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	
C40M17	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCCA GACCGCCAGCATCACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGATAAGTACG CCTGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTCATC TACCAGGACAGCAGAAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGG CAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG CCATGGACGAGGCCGATTACTATTGTCTAGGCCTGGGCCAGCAGCACC GTGGTGTGTTGGCGGCGGAACAAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCTCCGCCCCCTCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	160
C40M12	TCCTACGAGCTGACCCAGCCTCCCTCCGTGTCTGTGTCTCCTGGCCA GACCGCCAGCATCATCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACG TGTGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGGTGGTCATC TACCACGACAACAAGAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCGG CAGCAACAGCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG CCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGTCTGGGACAGCAGCACC GTGGTGTGTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCTCCGCCCCCTCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	161
C40M9	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCCA GAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCT ACAACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAGATAG ATTACGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGTCTG GACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGCTACGCC GGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCT GGGTGAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCCCTCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAG CCCCGTCAAGGCCGGGAGTGGAGACCACCACACCTCCAAACAAGCA ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	162
C40M102	AGTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCCA GACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACG TGTGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATC TACCAGGACAGCAAGCGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTGAGCGG CAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG	163

	CCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACC GTGGTGTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA	
C40M103	AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCCA GACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACG TGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGCTGGTGATC TACCAGGACAGCAAGCGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTGAGCGG CAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG CCATGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACC GTGGTGTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA	164
C40M104	AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGAGCGTGAGCCCCGGCCA GACCGCCAGCATCACCTGCAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAGTACG TGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCGTGGTGGTGATC TACCAGGACAGCAAGCGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTGAGCGG CAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGG CCATGGACGAGGCCCTACTACTACTGCCAGGCCTGGGTGAGCAGCACC GTGGTGTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAGCCCAA GGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACG CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAA GACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA	165
C40M105	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCCA GAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCT ACAACCTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCGGCAAGGCCCTAAG CTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAGATAG ATTGAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGTCTG GACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGCTACGCC GGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCT GGGTGAGCCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAG CCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCA ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA	162
C40M121	CAGTCTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCCA GAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCTCCGACGTGGGCGGCT	162

	ACAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGCAAGGCCCTAAG CTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAGATAG ATTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGTCTG GACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGCTACGCC GGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCT GGGTCAGCCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAG CCCCCTCAAGGCCGGAGTGGAGACCACCACCCCTCCAAACAAAGCA ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	
C40M126	CAGTGTGCCCTGACACAGCCTCCTAGCGCCTCTGGCTCTCCTGGCCA GAGCGTGACCATCAGCTGTACCGGCACAGCTCCGACGTGGGCGGCT ACAACTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCACCCCGCAAGGCCCTAAG CTGATGATCTACGAGGTGTCCAAGCGGCCAGCGGCGTGCCAGATAG ATTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACAGTGTCTG GACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGTAGCAGCTACGCC GGCAGCAACAACCTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCT GGGTCAGCCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGT GACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAG CCCCCTCAAGGCCGGAGTGGAGACCACCACCCCTCCAAACAAAGCA ACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA	162

Для идентификации потенциальных рисков иммуногенности каркасы антител сравнивали с ближайшими последовательностями генов зародышевой линии. VH и/или VL mAb C40M18, C40M17, C40M12 и C40M9 имели мутации по сравнению с ближайшими последовательностями зародышевой линии. В табл. 21 показаны каркасы антител и число мутаций.

Таблица 21

mAb	Ближайший каркас тяжелой цепи	Число мутаций в VH	Ближайший каркас легкой цепи	Число мутаций в VL
C40M67	IGHV3-23*03	0	IGKV3-20*01	Н/Д
C40M66	IGHV1-69*01	0	IGKV4-1*01	0
C40M63	IGHV1-69*01	0	IGKV4-1*01	0
C40M62	IGHV1-69*01	0	IGKV4-1*01	0
C40M59	IGHV1-69*01	0	IGKV1-39*01	0
C40M58	IGHV3-23*01	0	IGKV1-39*01	0
C40M56	IGHV3-23*01	0	IGKV1-39*01	0
C40M55	IGHV1-69*01	0	IGKV1-39*01	0
C40M51	IGHV3-23*01	0	IGKV1-39*01	0
C40M18	IGHV3-23*04	0	IGLV3-1*01	3
C40M17	IGHV3-23*04	2	IGLV3-1*01	0
C40M12	IGHV3-23*04	1	IGLV3-1*01	2
C40M9	IGHV4-39*01	3	IGLV2-8*01	0
C40M102	IGHV3-23*04	0	IGLV3-1*01	1
C40M103	IGHV3-23*04	0	IGLV3-1*01	0
C40M104	IGHV3-23*04	0	IGLV3-1*01	2
C40M105	IGHV4-39*01	0	IGLV2-8*01	0
C40M121	IGHV4-39*01	1	IGLV2-8*01	0

Последовательности каркаса:

```

IGHV3-23*03 (SEQ ID NO: 79)
>IGHV3-23*03
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV1-69*01 (SEQ ID NO: 80)
>IGHV1-69*01
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTAN
YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
IGHV3-23*01 (SEQ ID NO: 81)
>IGHV3-23*01
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-23*04 (SEQ ID NO: 82)
>IGHV3-23*04
EVQLVES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV4-39*01 (SEQ ID NO: 73)
>IGHV4-39*01
QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGST
YYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 74)
EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP
IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 84)
>IGKV4-1*01
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQQYYSTP
IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 85)
>IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLASV GDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP
IGLV3-1*01 (SEQ ID NO: 86)
IGLV3-1*01
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPE
RFGSGNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSST
IGLV2-8*01 (SEQ ID NO: 87)
>IGLV2-8*01
QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYEVSKRPSG
VPDRFSGSKSGNTASLT VSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNF

```

Пример 6. Оптимизация агонистических антител к CD40.

VH C40M9 (C40H43; SEQ ID NO: 60) в каркасной области имела три аминокислоты, которые отличались от ближайшей последовательности зародышевой линии человека IGHV4-39 (SEQ ID NO: 73). Выравнивание остатков 1-98 C40H43 в сравнении с IGHV4-39 показано на фиг. 3.

IGHV4-39 с SEQ ID NO: 73:

```

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGST
YYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

```

Варианты C40H43 были созданы с целью получения мутаций в положениях, отличных от последовательностей зародышевой линии, индивидуально или в комбинации. Полученные в результате VH-цепи комбинировали с родительской VL-цепью BCML12 и полученные в результате антитела исследовали на связывание и проводили функциональные анализы.

VL C40M18 (C40L64; SEQ ID NO: 66) в каркасной области имела две аминокислоты, которые отличались от ближайшей последовательности зародышевой линии человека IGLV3-1 (SEQ ID NO: 86). Выравнивание VL C40M18 в сравнении с IGLV3-1 показано на фиг. 4.

IGLV3-1 (SEQ ID NO: 86)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPE

RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSST

Варианты C40L64 были созданы с целью получения мутаций в положениях, отличных от последовательностей зародышевой линии, индивидуально или в комбинации. Кроме того, произошла мутация остатка цистеина в CDR1 C40L64. Полученные в результате варианты VL-цепи комбинировали с исходной VH-цепью C40H48 и полученные в результате антитела исследовали на связывание и проводили функциональные анализы.

Созданные варианты антител показаны в табл. 22. Антитела C40M103 и C40M104 с цепью C40L64 с мутировавшим цистеином LCDR1 имеют последовательность LCDR1 SGDKLGDKYVS (SEQ ID NO: 31), а другие CDR являются такими, как в исходных VH и VL. Все созданные варианты антител были клонированы как IgG1.

Таблица 22

mAb	VH	VH с SEQ ID NO:	Число замен VH *	VL	VL с SEQ ID NO:	Число замен VL *
C40M102	C40H48	57	0	C40L70	70	2
C40M103	C40H48	57	0	C40L69	71	3
C40M104	C40H48	57	0	C40L68	72	1
C40M105	C40H52	61	3	BCML12	69	0
C40M121	C40H53	62	2	BCML12	69	0
* по сравнению с родительским						

Полученные в результате антитела исследовали на их связывание с CD40 и проводили функциональные анализы для оценки влияния (при наличии) выполненных замен. В табл. 23 показаны значения EC₅₀ для связывания mAb с CD40 на В-клетках, ДК или на клетках HEK-Blue™ CD40L. mAb C40M102, C40M103 и C40M104 сохранили способность связывания, сопоставимую с таковой у родительского антитела C40M18. Антитело C40M105 имело сниженное связывание по сравнению с исходным антителом C40M9.

Таблица 23

Антитело	EC50 (мкг/мл)		
	HEK-Blue™ CD40L	В-клетки человека	ДК человека
C40M102	0,1621	0,15930	0,4379
C40M103	0,1122	0,07502	0,1430
C40M104	0,1775	0,10960	0,2526
C40M105	2,1610	6,64800	5,7650
C40M9	0,1433	0,06091	0,1522
C40M18	0,1499	0,11000	0,2674
C40M9*	0,6146	0,01910	0,04620
C49M121*	0,464	0,02283	0,05720
* Результаты из отдельных экспериментов			

Антитела исследовали на агонистическую активность в клетках HEK-Blue™ CD40L и в первичных В-клетках. В табл. 24 показаны значения EC₅₀, полученные при анализе выбранных антител. Антитела C40M102, C40M103 и C40M104 имели аналогичную эффективность активации В-клеток по сравнению с родительским mAb C40M18. Антитело C40M105 имело сниженную активность по сравнению с родительским антителом C40M9.

Таблица 24

Антитело	Анализ EC ₅₀ (мкг/мл)		
	HEK-Blue™ CD40L	ДК человека (HLA-DR)	В-клетки человека (CD83)
C40M102	0,07515	0,3667	0,02388
C40M103	0,002742	0,3875	0,004790
C40M104	0,03078	0,1655	0,01671
C40M105	0,01733	2,972	0,002819
C40M9	0,01376	0,1178	0,0007661
C40M18	0,06962	0,1662	0,02262
C40M9*	0,006210	0,01671	0,0001452
C40M121*	0,006332	0,01852	0,0003343
* Результаты из отдельных экспериментов			

Пример 7. Агонистические антитела к CD40 связываются с высокой аффинностью с CD40 человека.

Измерения аффинности с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) выполняли с помощью системы ProteOn XPR36 (BioRad). Биосенсорную поверхность готовили путем связывания антитела к Fc человеческого IgG (Jackson кат. № 109-005-098) с модифицированным слоем альгинатного полимера поверхностью чипа GLC (BioRad, кат. № 176-5011) с использованием инструкций производителя по проведению химической реакции аминного сочетания. Было иммобилизовано приблизительно 5000 RU (отвечающих единиц) mAb. Кинетические эксперименты выполняли при 25°C в подвижном буферном растворе (DPBS+0,01% полисорбат P20+100 мкг/мл BSA). Для проведения кинетических экспериментов иммобилизовали 200 RU mAb с последующим введением аналитов (CD40 человека или яванского макака) в 5 концентрациях (в 4-кратном серийном разведении). Фазу ассоциации отслеживали в течение 3 мин при 50 мкл/мин с последующим 15-минутным пропуском потока буферного раствора (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными импульсами 100 mM H₃PO₄ (Sigma, кат. № 7961) при 100 мкл/мин.

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения ProteOn Manager. Сначала корректировали данные по отношению к фону, используя промежуточные участки. Впоследствии для данных выполняли двойное вычитание эталона, используя ввод буферного раствора вместо ввода аналитов. Кинетический анализ данных выполняли, используя модель связывания Ленгмюра 1:1. Результат для каждого mAb регистрировали в формате Ka (скорость ассоциации), Kd (скорость диссоциации) и K_D (равновесная константа диссоциации).

Краткий обзор кинетических показателей аффинности для выбранных mAb к CD40 в отношении связывания с CD40 человека показано в табл. 25. Параметры, указанные в этой таблице, для всех образцов были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, K_D=kd/ka.

Таблица 25

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (М)
C40M9 (n=5)	7,27 (1,83)E+05	2,85 (0,97)E-03	4,09 (1,51)E-09
C40M12	1,30E+06	1,76E-04	1,36E-10
C40M17	2,74E+06	8,06E-05	2,94E-11
C40M18	1,07E+06	1,62E-04	1,51E-10
C40M51	7,40E+05	8,78E-04	1,19E-09
C40M55 (n=2)	9,44 (8,68-10,2)E+05	2,03 (1,88-2,17)E-03	2,15 (2,12-2,17)E-09
C40M56	7,77E+05	1,01E-03	1,30E-09
C40M58	4,17E+05	7,14E-04	1,71E-09
C40M59	1,18E+05	1,06E-03	9,00E-09
C40M62	1,89E+05	2,47E-03	1,31E-08
C40M63	5,28E+05	6,41E-04	1,21E-09
C40M66	3,78E+05	1,16E-03	3,05E-09
C40M67	1,63E+05	3,10E-04	1,91E-09

C40M9, n=5 повторных экспериментов, значения перечислены в виде среднего показателя и (стандартного отклонения).

C40M55, n=2 повторных эксперимента, значения перечислены в виде среднего показателя и (диапазона).

Два образца (C40M9, C40M55) недостаточно соответствовали модели связывания 1:1.

Сводные данные кинетики аффинности для выбранных mAb к CD40 в отношении связывания с CD40 яванского макака показано в табл. 26. Параметры, указанные в этой таблице, для всех образцов были получены из модели связывания Ленгмюра 1:1. Аффинность, $K_D = k_d/k_a$.

Таблица 26

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
C40M9 (n=3)	9,01(1,02)E+05	1,26(0,07)E-03	1,42(0,24)E-09
C40M12	1,81E+06	4,41E-04	2,43E-10
C40M17	4,27E+06	1,57E-04	3,68E-11
C40M18	1,32E+06	9,41E-05	7,12E-11
C40M51	4,19E+05	9,49E-04	2,27E-09
C40M55	8,31E+05	2,15E-03	2,59E-09
C40M56	8,06E+05	6,47E-04	8,03E-10
C40M58	4,53E+05	7,23E-04	1,60E-09
C40M59	1,44E+05	9,95E-04	6,92E-09
C40M62	3,43E+05	9,08E-04	2,64E-09
C40M63	7,46E+05	3,07E-04	4,12E-10
C40M66	3,52E+05	5,77E-04	1,64E-09
C40M67	1,84E+05	3,41E-04	1,85E-09

C40M9. n=3 повторных эксперимента, значения перечислены в виде среднего показателя и (стандартного отклонения).

Четыре образца (C40M55, C40M56, C40M62, C40M63) недостаточно соответствовали модели связывания 1:1.

Пример 8. Конструирование Fc агонистических антител к CD40.

Для создания mAb C4 0M12 6A в C40M121 вводили мутацию S267E. По результатам оценки индуцированной поверхностной экспрессии HLA-DR на дендритных клетках (фиг. 6) был показан усиленный агонизм антитела C40M126, независимый от перекрестного сшивания.

Пример 9. Кристаллическая структура C40M126 в комплексе с человеческим CD40.

Способы.

Меченный His-меткой внеклеточный домен (ECD) человеческого CD40 был экспрессирован в инфицированных бакуловирусом клетках насекомых Hi5 и очищен с помощью аффинной и гель-фильтрационной хроматографии в Genscript (г. Пискаатауэй, штат Нью Джерси, США). Меченный His-меткой Fab-фрагмент mAb C40M126 был экспрессирован в клетках насекомых HEK293 Expi и очищен с помощью аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Комплекс антитело-антиген получали путем смешивания компонентов в молярном соотношении 1:1,2 с избытком Fab и инкубировали в течение ночи при 4°C. Белок концентрировали до 12 мг/мл в 20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl и кристаллизовали методом паровой диффузии из раствора, содержащего 1,6 M сульфата аммония, 5% ПЭГ 400, 0,1 M HEPES, pH 7,5. Один кристалл был перенесен в маточный раствор с добавлением 24% глицерина, заморожен в жидком азоте и использован для получения данных рентгеновской дифракции. Структуру определяли с разрешением 3,0 Å.

Результаты.

C40M126 связывает CD40 на сайте, расположенном дистально относительно клеточной поверхности (фиг. 5). Эпитоп является конформационным и включает в себя непрерывный отрезок аминокислотных остатков 46-64, который образует бета-шпильку, и еще два остатка 75-76 из соседней петли (нумерация остатков в соответствии с SEQ ID NO: 75). Остатки антител, вовлеченные в связывание с CD40, включают в себя 9 остатков из легкой цепи и 11 остатков из тяжелой цепи (фиг. 6). В связывание вовлечены все шесть CDR. Интерфейс антитело-антиген является протяженным и охватывает участок почти 900 Å² в каждой молекуле.

C40M126 представляет собой вариант C40M9, который по сравнению с C40M9 имеет две мутации в каркасной области тяжелой цепи, I17T и N85S. Эти два остатка ориентированы наружу от сайта связывания mAb и не влияют на характеристики связывания антитела. Следовательно, ожидают, что C40M9 будет связываться с теми же эпитопами, что и C40M126.

Поэтому все выводы, относящиеся к эпитопу и механизму действия, сохраняются и для C40B8.

CD40 яванского макака на 95% идентичен человеческому CD40 в ECD и отличается от человеческого CD40 только в одном положении внутри эпитопа. CD40 игрушки имеет больше аминокислотных отличий по сравнению с CD40 человека, 4 из которых находятся в пределах эпитопа. Все различия находятся на периферии эпитопа и, вероятно, будут переноситься антителом, т. е. ожидают, что C40M9 является перекрестно-реагирующим с CD40 как яванского макака, так и игрушки.

Наложение структуры антитело-антиген на комплекс рецептор-лиганд, доступный из базы данных белков Protein Data Bank (регистрационный номер 3QD6), показывает, что эпитопы C40M126 и CD40L не перекрываются. Однако C40M126 и CD40L будут конкурировать за ту же молекулу CD40 из-за стерического эффекта, например, C40M126 будет блокировать взаимодействие CD40L-CD40.

Пример 10. Фармакокинетическое исследование антител к CD40 у яванского макака.

Материалы и способы.

Интактные яванские макаки в состоянии натошак в течение ночи (или по меньшей мере 8 ч) получали одну болюсную внутривенную инъекцию антител к CD40: C40M9, C40M126 или контрольного антитела CP-870,893 в дозе 0,1, 10 или 10 мг/кг. Благополучие животных, участвующих в исследовании, соответствовало Закону о защите прав животных Министерства сельского хозяйства США (USDA) (код 9 федеральных правил (CFR), части 1, 2 и 3).

Для проведения биоаналитических исследований из бедренной артерии брали образцы крови объемом около 1 мл до введения дозы и через 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 ч и 7, 14, 21 и 28 дней после введения дозы. Образцы оставляли для свертывания при температуре окружающей среды в течение по меньшей мере 15 мин, после чего их центрифугировали в условиях окружающей среды в течение 30 мин после взятия образцов в каждом интервале времени. Полученную сыворотку по возможности разделяли на три приблизительно одинаковых аликвоты и помещали в 96-луночные планшеты. Образцы хранили в замороженном состоянии при температуре от -60 до 90°C.

Результаты.

Самцам яванских макаков вводили одну внутривенную болюсную инъекцию C40M9, C40M126 или контрольного антитела CP-870,893 в дозе 0,1, 1,0 или 10 мг/кг. Как правило, при введении CP-870,893 наблюдали тенденцию к возникновению эффектов или наибольшую выраженность эффектов. Были получены следующие результаты.

Снижение массы эритроцитов средней степени при введении дозы 10 мг/кг C40M9 и 1,0 и 10 мг/кг CP-870,893 с подтверждением соответствующего регенеративного ответа, о чем свидетельствует увеличение количества ретикулоцитов, ширина распределения эритроцитов (RDW), полихромазия и/или обнаружение в микроскопическом исследовании мазка крови содержащих ядро эритроцитов; уменьшение массы эритроцитов имело тенденцию к разрешению ко дням 21 и/или 28, в то время как регенеративный ответ обычно сохранялся.

Преходящее уменьшение количества тромбоцитов от легкой до средней степени при введении дозы 0,1, 1,0, и 10 мг/кг CP-870,893.

Преходящее снижение концентрации альбумина средней степени, повышение концентрации глобулина средней степени и/или цитоплазматические изменения нейтрофилов при введении дозы 10 мг/кг CP-870,893, что указывает на наличие незначительного воспалительного стимула.

Снижение концентрации фибриногена средней степени при введении дозы 10 мг/кг CP-870,893 на 14-28-й дни.

Данные, свидетельствующие о преходящем изменении коагуляции при введении дозы 10 мг/кг CP-870,893 на основании незначительного продления частично активированного тромбопластинового времени (APTT) и протромбинового времени, которые, вероятно, не были биологически значимыми из-за небольшой величины изменения.

Гематология.

В образцах, взятых у самцов через 72 ч после введения дозы, на 7- и/или 14-й день после введения 10 мг/кг C40M9 и 1,0 и 10 мг/кг CP-870,893, наблюдали снижение массы эритроцитов средней степени (до -29%; процентное изменение выражали как групповое среднее арифметическое значение по сравнению со средним арифметическим значением до исследования), которое имело большую величину, чем снижение массы эритроцитов (до -20%) в других экспериментальных группах. Снижение массы эритроцитов в других экспериментальных группах, как правило, имело сходную величину во всех группах; считали, что они, наиболее вероятно, большей частью связаны с процедурой и повторным взятием анализов для фармакокинетического исследования крови, хотя проведение окончательного сравнения было невозможным из-за отсутствия контрольных образцов для сравнения. Более значительное снижение массы эритроцитов при введении 10 мг/кг C40M9 и 1,0 и 10 мг/кг CP-870,893 наиболее вероятно связано с испытуемыми препаратами с одновременным влиянием самой процедуры. Снижение массы эритроцитов имело тенденцию к разрешению к 21 и/или 28 дням.

В образцах, взятых на 7-28-й дни, во всех группах наблюдали незначительное или выраженное увеличение количества ретикулоцитов (до +883%) по сравнению с показателем до исследования, которое свидетельствовало о соответствующем регенеративном ответе на снижение массы эритроцитов. Также наблюдали сопутствующие увеличения ширины распределения эритроцитов (RDW; до +44%, что свидетельствует об увеличении вариабельности размера эритроцитов), а также увеличение полихромазии и/или обнаружение в микроскопическом исследовании мазка крови содержащих ядро эритроцитов при введении 1,0 и 10 мг/кг CP-870,893, что также свидетельствует о регенеративном ответе. Регенеративный ответ был наиболее выражен при введении дозы 10 мг/кг CP-870,893, что совпадает с наибольшим снижением наблюдаемой массы эритроцитов.

В образцах, взятых через 72 ч после введения дозы $\geq 0,1$ мг/кг СР-870,893, а также в образцах, взятых на 7- и 14-й дни после введения дозы 10 мг/кг СР-870,893, наблюдалось преходящее уменьшение количества тромбоцитов от легкой до средней степени (до -81%) по сравнению с показателем до исследования, что считали связанным с действием СР-870,893. За этими уменьшениями следовало преходящее увеличение количества тромбоцитов в последующих взятых образцах, что свидетельствовало о соответствующем регенеративном ответе и, как правило, разрешалось в образцах, взятых на 28-й день. На фиг. 8 показано количество тромбоцитов с течением времени у животных, которым вводили 10 мг/кг С40М9, С40М126 или контрольного антитела СР-870,893. У животных, которым вводили С40М9 или С40М126, не наблюдали преходящего уменьшения количества тромбоцитов.

Во взятых на 14-й день образцах у одного самца, которому вводили дозу 10 мг/кг СР-870,893, при микроскопическом исследовании мазка крови наблюдали цитоплазматическое изменение нейтрофилов. Это изменение указывает в большей степени на воспалительный стимул, поскольку связано со снижением концентрации альбумина и повышением концентрации глобулина.

В образцах, взятых у самцов через 72 ч после введения дозы и/или на 7-й день после введения $\geq 0,1$ мг/кг СР-870,893 и 10 мг/кг С40М126, наблюдали преходящее уменьшение количества лимфоцитов от легкой до средней степени (до -46%) по сравнению с показателем до исследования, которое обычно разрешалось в последующих взятых образцах. Эти изменения имели неопределенную связь с испытываемыми препаратами по существу из-за сходной величины во всех экспериментальных группах и отношения средних и индивидуальных значений к ожидаемым значениям для биологических и связанных с процедурами вариаций.

Все другие колебания в гематологических конечных точках считали незначимыми из-за их малой величины, спорадического характера, близости к введению дозы и/или отношению к ожидаемым значениям для биологических и связанных с процедурами вариаций.

Коагуляция.

В образцах, взятых на 7-й и 14-й день у самцов, которым вводили 10 мг/кг СР-870,893, наблюдали незначительные продления АРТТ (до +32%) и протромбинового времени (до +22%) по сравнению с показателем до исследования. Эти изменения были связаны с СР-870,893 и свидетельствовали об измененной коагуляции, хотя они и не являются биологически значимыми из-за небольшой величины изменений. В последующих взятых образцах они разрешались.

В образцах, взятых на 14-, 21- и 28-й день у самцов, которым вводили 10 мг/кг СР-870,893, наблюдали незначительное снижение концентрации фибриногена (до -66%) по сравнению с показателем до исследования. Эти изменения были связаны с СР-870,893 и могли быть связаны с измененной коагуляцией. Другие колебания времени коагуляции (т.е. АРТТ и протромбинового времени) и концентрации фибриногена считали незначимыми из-за их малой величины, направления изменения и/или отношения к ожидаемым значениям.

Биохимическое исследование.

В образцах, взятых на 7-, 14- и 21-й дни у самцов, которым вводили 10 мг/кг СР-870,893, наблюдали снижение концентрации альбумина средней степени (до -30%) и повышение концентрации глобулина (до +33%) по сравнению с показателем до исследования. Эти изменения считали связанными с испытываемым препаратом и позволяли предположить наличие незначительного воспалительного стимула, поскольку были связаны с цитоплазматическими изменениями нейтрофилов у одного из двух животных (см. раздел "Гематология"). Эти изменения имели тенденцию к разрешению в образцах, взятых на 28-й день. Снижение концентрации альбумина от минимальной до легкой степени (до -16%) обычно наблюдали во всех взятых образцах в других экспериментальных группах, хотя в образцах, взятых на 21- и/или 28-й день, это снижение обычно возвращалось к показателям до исследования. Эти снижения концентраций считали наиболее вероятно связанными с процедурой, поскольку они были связаны со снижением массы эритроцитов (см. раздел "Гематология"). Снижение концентрации альбумина по существу сопровождалось снижением концентрации кальция, поскольку альбумин является основным переносчиком кальция в крови, а также сопутствующим снижением концентрации общего белка и/или соотношения альбумина и глобулина. Результаты, коррелирующие с этими изменениями, среди других конечных точек исследования отсутствовали.

В образцах, взятых у самцов через 72 часа и/или на 7-й день после введения дозы во всех экспериментальных группах, кроме группы, которой вводили 1,0 мг/кг С40М126, наблюдали повышение концентрации аспаратаминотрансферазы (АСТ; до +529%) и/или аланинаминотрансферазы (АЛТ; до +374%) от легкой до средней степени по сравнению с показателем до исследования, которое обычно разрешалось в последующих взятых образцах и наиболее вероятно указывало на незначительное повреждение мышц. Из-за отсутствия модели соответствия ответа дозе, преходящего характера и отсутствия коррелирующих результатов среди других конечных точек исследования считали, что эти изменения наиболее вероятно связаны с процедурой, возможно связаны с повторной венепункцией.

Все другие колебания в биохимических конечных точках считались незначимыми из-за их малой величины, спорадического характера, близости к введению дозы и/или отношения к ожидаемым значениям.

ниям.

Данные о токсичности, полученные в этом исследовании переносимости у яванского макака, показывают, что C40M9 и C40M126 индуцируют меньшее истощение тромбоцитов и более низкие уровни выброса цитокинов по сравнению с контрольным антителом, предположительно из-за активации АПК, обусловленной агонистической активностью антитела к CD40. Взятые вместе, C40M9 и C40M126 могут вызывать меньшую токсичность, связанную с активностью CD40, при одновременном поддержании надежной активации АПК, как показано при активации ДК *in vitro*.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное агонистическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с CD40 человека с последовательностью SEQ ID NO: 75, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 5, HCDR2 с SEQ ID NO: 10, HCDR3 с SEQ ID NO: 18, переменную область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 32, LCDR2 с SEQ ID NO: 34 и LCDR3 с SEQ ID NO: 47.

2. Антитело по п.1, где антитело:

а) связывается с CD40 человека с SEQ ID NO: 75 в пределах остатков 46-64 или 75-76 CD40 человека с SEQ ID NO: 75;

б) связывается с CD40 человека с SEQ ID NO: 75 с константой диссоциации (K_D), равной примерно 5×10^{-9} М или менее при измерении K_D с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,01% полисорбат 20 (PS-20) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; и/или

с) требует перекрестного сшивания для проявления агонистической активности на В-клетках и дендритных клетках (ДК), где агонистическую активность на В-клетках измеряют посредством поверхностной экспрессии CD23 на В-клетках, а агонистическую активность на ДК измеряют посредством поверхностной экспрессии CD83 на ДК в присутствии перекрестно сшивающего агента (антитела к F(ab')₂ человека) в концентрации 20 мкг/мл, а поверхностную экспрессию CD23 и CD83 измеряют с использованием проточной цитометрии.

3. Антитело по п.1, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 62 или 61 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 69.

4. Антитело по п.1, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 62 и 69 соответственно.

5. Антитело по п.1, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 61 и 6 соответственно.

6. Антитело по п.1, где антитело содержит каркасную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 73 и каркасную область легкой цепи с SEQ ID NO: 87.

7. Антитело по п.1, где антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

8. Антитело по п.3, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь с SEQ ID NO: 129 и 136 соответственно.

9. Антитело по п.3, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь с SEQ ID NO: 128 и 136 соответственно.

10. Антитело по п.3, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь с SEQ ID NO: 127 и 136 соответственно.

11. Антитело по п.7, дополнительно содержащее по меньшей мере одну мутацию в области Fc, где по меньшей мере одна мутация в области Fc представляет собой S267E, мутацию S267E/I332E, мутацию S267E/L328F, мутацию G236D/S267E или мутацию E233D/G237D/H268D/P271G/A330R/P238D, нумерация остатков соответствует индексу EU.

12. Мультиспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD40 человека с последовательностью SEQ ID NO: 75, содержащее антитело по п.1.

13. Антитело по п.12, где антитело представляет собой биспецифическое антитело.

14. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по п.1, связанное с цитотоксическим агентом.

15. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по п.1, связанное с визуализирующим агентом.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по п.16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Набор для активации антигенпрезентирующих клеток (АПК) и В-клеток, отличающийся тем, что он содержит антитело по п.1.

19. Набор по п.18, дополнительно содержащий реагенты для детекции антитела и инструкции по применению.

20. Способ активации антигенпрезентирующих клеток (АПК) и В-клеток у индивида, включающий введение индивиду выделенного антитела по п.1.

21. Способ по п.20, где индивид болен раком.

22. Способ по п.21, где рак представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

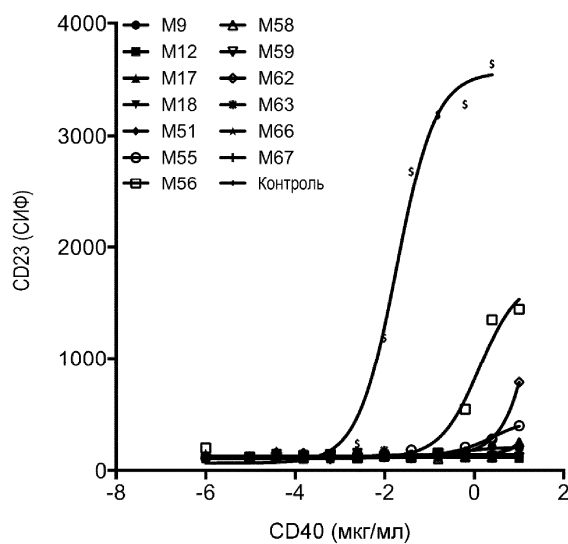
23. Способ по п.22, где солидная опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак почки, рак

легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак молочной железы или рак головы и шеи.

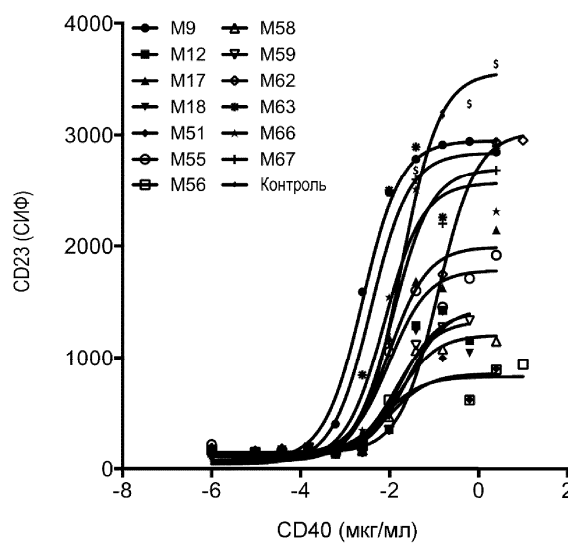
24. Способ по п.21, где антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

25. Способ по п.24, где второй терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, стандартный лекарственный препарат для лечения солидной опухоли или гематологической злокачественной опухоли или модулятор иммунной контрольной точки.

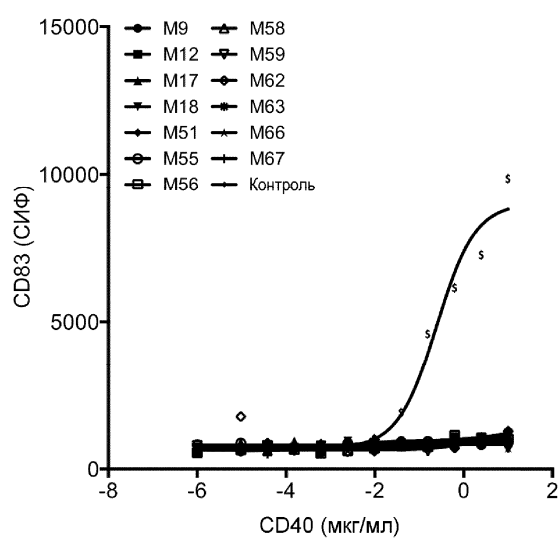
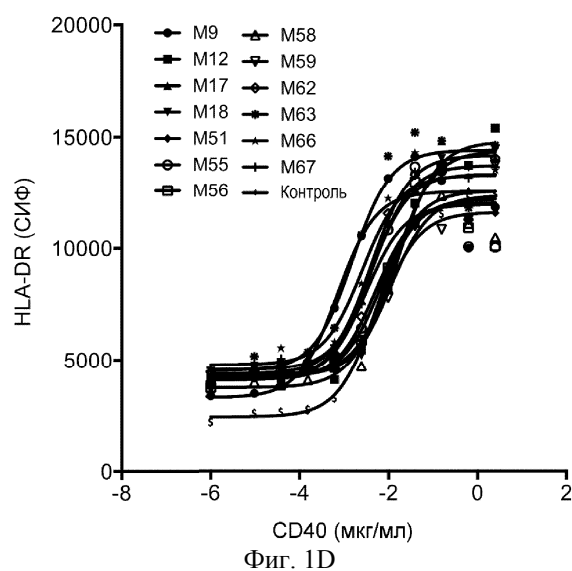
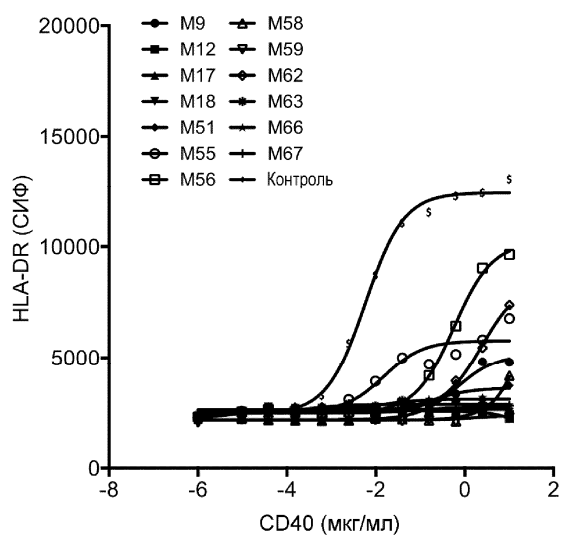
26. Способ по п.24, где второй терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или отдельно.

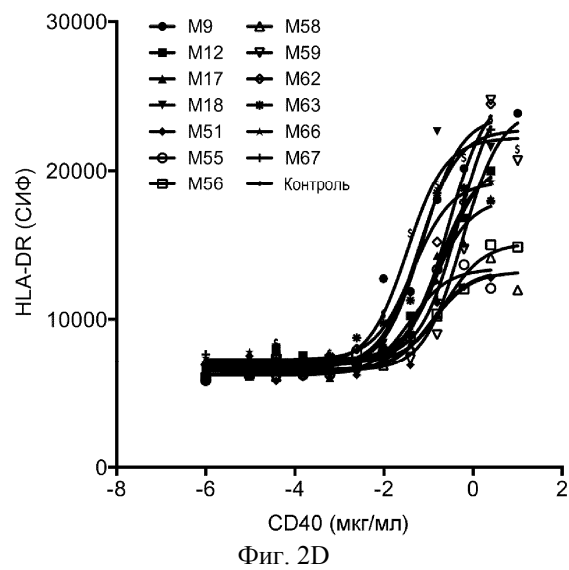
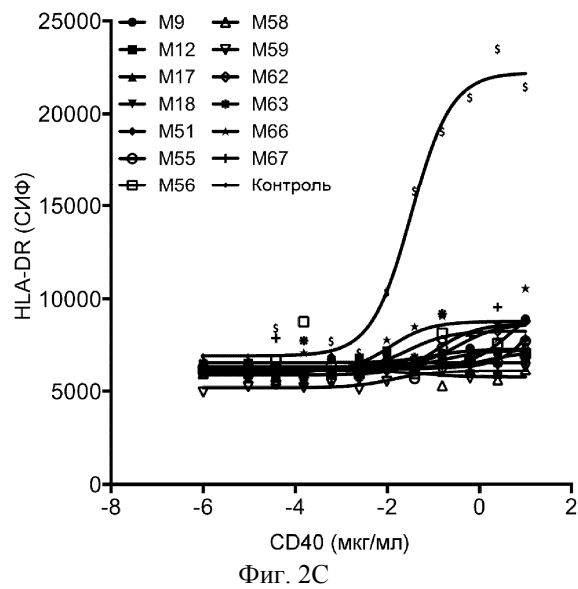
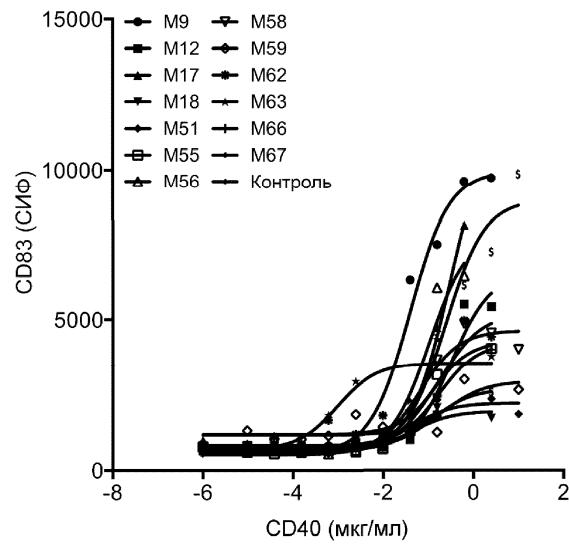


Фиг. 1А



Фиг. 1В





	1	30
C40H43	QLQLQESGPGLVKPFSEILSLTCTVSGGSIS	
IGHV4-39	QLQLQESGPGLVKPFSETLSLTCTVSGGSIS	

	31	60
C40H43	SSSYWGWIQQPPGKLEWIGNIYYRGDTY	
IGHV4-39	SSSYWGWIQQPPGKLEWIGSIYYSGSTY	

	61	90
C40H43	YSPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	
IGHV4-39	YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	
	*.*****	
	91	98
C40H43	TAVYYCAK	
IGHV4-39	TAVYYCAR	
	*****:	

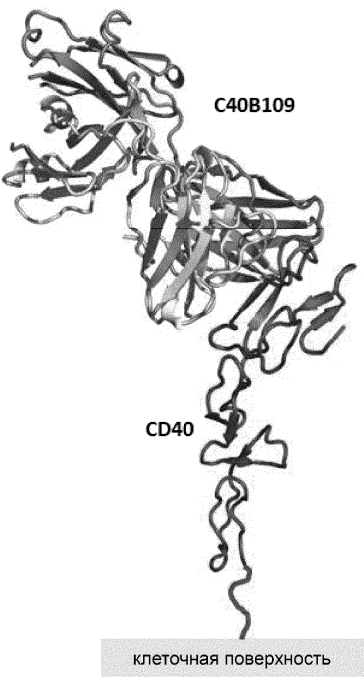
Фиг. 3

	1	30
C40L64	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDK	
IGLV3-1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDK	

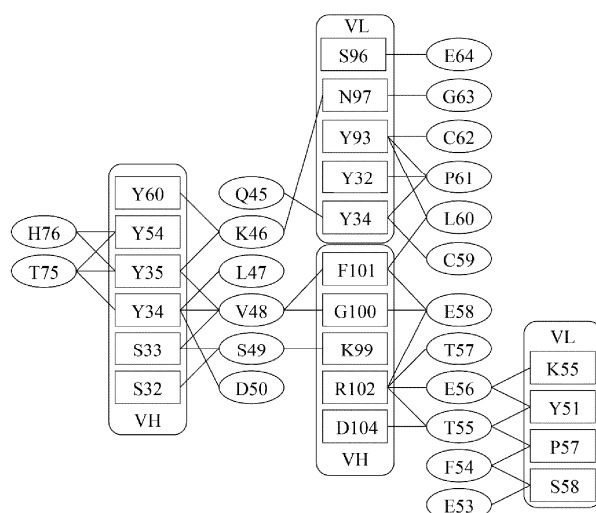
	31	60
C40L64	YVCWYQQKPGQSPVVVIYQDSKRPSGIPER	
IGLV3-1	YACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPER	
	*.*****;	
	61	90
C40L64	FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAYYQCQAW	
IGLV3-1	FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYQCQAW	

	91	94
C40L64	VSST	
IGLV3-1	DSST	

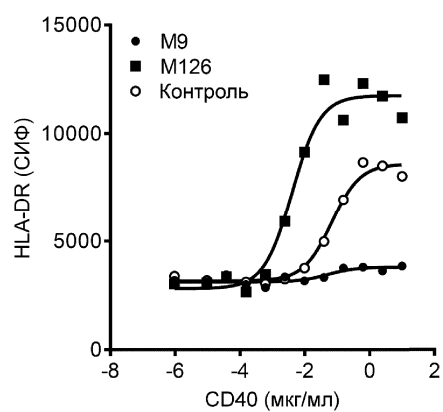
Фиг. 4



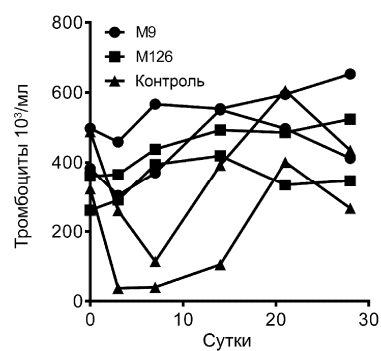
Фиг. 5



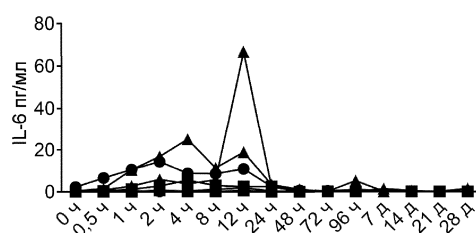
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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