

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040943**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.22**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201890434**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.08.04**

---

**(54) АНТИТЕЛА К CD154 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/201,150; 62/367,660**

**(32)** **2015.08.05; 2016.07.28**

**(33)** **US**

**(43)** **2018.10.31**

**(86)** **PCT/US2016/045574**

**(87)** **WO 2017/024146 2017.02.09**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Франссон Йохан (CA), Леу Жослен,  
Обмолова Галина (US), Сури Аниш  
(BE), Тэн Фан, Тепляков Алексей,  
Чжоу Хун (US)**

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

**(56)** US-A1-20080305116  
NCBI P29965 CD40L HUMAN (22 July  
2015) [Retrieved from the Internet 17 October  
2016: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/231718?sat=21&satkey=36941873>>]; 100% identity to SEQ  
ID NO:1

US-A1-20130030159

WO-A2-2012058137

WO-A2-2012118903

WO-A2-2006125201

US-A1-20030103978

---

**(57)** Изобретение относится к антагонистическим антителам, специфически связывающим CD154, полинуклеотидам, кодирующим данные антитела или фрагменты, а также способам получения и применения указанных продуктов.

---

**B1**

**040943**

**040943**

**B1**

### Перекрестные ссылки на смежные заявки

Заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США сер. № 62/367,660, поданной 28 июля 2016 г., и предварительной заявке на патент США сер. № 62/201,150, поданной 5 августа 2015 г., все содержимое которых полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

### Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфически связывающим CD154, полинуклеотидам, кодирующим данные антитела или фрагменты, а также способам получения и применения указанных продуктов.

### Предпосылки создания изобретения

CD154, также именуемый лигандом CD40 (CD40L), др39, родственный TNF активирующий белок (TRAP), антиген 5с8 или T-BAM, представляет собой тримерный трансмембранный белок из суперсемейства факторов некроза опухолей (TNF). CD154 экспрессируется зависимым от активации и ограниченным по времени образом на поверхности T-клеток CD4<sup>+</sup>. CD154 также экспрессируется после активации в субпопуляции T-клеток CD8<sup>+</sup>, базофилах, тучных клетках, эозинофилах, естественных киллерных клетках, В-клетках, макрофагах, дендритных клетках и тромбоцитах. CD154 также присутствует в крови в растворимой форме.

CD154 связывается с CD40 на антигенпрезентирующих клетках (APC), приводя к различным ответам, в зависимости от типа клетки-мишени. Взаимодействие CD40-CD154 необходимо для нормальных взаимодействий T- и В-клеток, в том числе, для повышения костимуляции, праймирования T-клеток, продукции цитокинов, переключения классов антител, созревания аффинности и продукции антител и аутоантител.

Показано, что нарушение работы пути CD40/CD154 при помощи блокады CD154 является полезным при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), диабет I типа (Т1Д) и отторжение аллотрансплантата. У человека мутации либо в CD40, либо в CD154 приводят к синдрому гипер-IgM, характеризующемуся недостаточностью изотипов IgG или IgA (Aruffo et al., Cell 72:291, 1993).

Антитела к CD154 были описаны, например, в международных патентных публикациях № WO1993/08207, WO1994/10308, WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860, WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 и WO2013/056068.

Показано, что антитела к CD154 эффективны при лечении аутоиммунных заболеваний у человека. Однако наблюдаемая при лечении тромбоэмболия, из-за активации тромбоцитов, препятствует длительным клиническим исследованиям. Показано, что причиной активации тромбоцитов антителом 5с8 к CD154 является взаимодействие с FcγRIIa на тромбоцитах (Xie et al., J Immunol 192:4083-4092, 2014).

Таким образом, существует потребность в дополнительных антителах к CD154 с улучшенными профилями безопасности и эффективности.

### Изложение сущности изобретения

В изобретении предлагается антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее человеческий CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) и HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), причем необязательно

остаток S1 HCDR1 мутирован в A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T или V;

остаток I4 HCDR1 мутирован в M, L или V;

остаток S5 HCDR1 мутирован в A;

остаток S3 HCDR2 мутирован в A, T или V;

остаток P4 HCDR2 мутирован в V, T, L Q или E;

остаток N8 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;

остаток T9 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;

остаток N10 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;

остаток S1 HCDR3 мутирован в A или M;

остаток R2 HCDR3 мутирован в A, S, Q или K; и

остаток L7 HCDR3 мутирован в M.

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, причем антитело содержит определенные аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL), описанные в настоящем документе.

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, причем антитело содержит определенные аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, описанные в настоящем документе.

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающее

вающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 44 и 52, соответственно;

VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66; или

тяжелую цепь с SEQ ID NO: 80 и легкую цепь с SEQ ID NO: 81.

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, причем CD154 представляет собой гомотример, а антитело связывает первый мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 182-207 CD154 и второй мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 176-253 CD154, при этом нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

В изобретении также предлагается иммуноконъюгат, содержащий антитело или антигенсвязывающий участок антитела изобретения, связанный с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

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

В изобретении также предлагается полинуклеотид, кодирующий VH антитела изобретения, VL антитела изобретения или VH и VL антитела изобретения.

В изобретении также предлагается вектор, содержащий полинуклеотид изобретения.

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

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

В изобретении также предлагается способ лечения аутоиммунного заболевания или иммуноопосредованного воспалительного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела изобретения или фармацевтической композиции изобретения требующему лечению пациенту в течение времени, достаточного для лечения заболевания.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом изобретения.

В изобретении также предлагается набор, содержащий антитело изобретения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показано влияние Fc антитела на активацию тромбоцитов иммунными комплексами (IC) CD154:антитело. IC растворимого человеческого CD154 (shCD154, обозначен на фигуре как SCD40L) и антитела 5c8 к CD154 (изотип IgG1) (IC 5c8IgG1) активировал тромбоциты, тогда как IC shCD154 и 5c8, клонированного на заглушенных IgG1-каркасах IgG1sigma, IgG1sigma-YTE, IgG2sigma или IgG2sigma-YTE (5c8IgG1z, 5c8IgG1z-YTE, 5c8IgG2z или 5c8IgG2z-YTE, соответственно) влияния не оказывал. Активацию тромбоцитов оценивали как % экспрессирующих PAC-1 (антитело PAC-1 специфически распознает конформационно активную форму интегрина  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) и CD62p (экспрессия P-селектина на поверхности) тромбоцитов от их общего числа. ADP (аденозинтрифосфат): положительный контроль. PBS (фосфатно-солевой буфер): отрицательный контроль. Активацию тромбоцитов оценивали у пяти доноров. Результаты представлены как среднее по каждому эксперименту  $\pm$  CO.

На фиг. 2 показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (sCD40L на фигуре) и имеющих заглушенную эффекторную функцию антител к CD154 IgG2sigma/к C4LB5, C4LB89, C4LB189, C4LB191, C4LB199 и C4LB150 не активируют тромбоциты. Активацию тромбоцитов оценивали как % экспрессирующих PAC-1 и CD62p тромбоцитов от их общего числа. IC shCD154 и 5c8IgG1 (5c8IgG1 IC) активировали тромбоциты. ADP: положительный контроль. Активацию тромбоцитов оценивали у пяти доноров. Результаты представлены как среднее по каждому эксперименту  $\pm$  CO.

На фиг. 3 показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (SCD40L) и антител к CD154 C4LB89 (IgG2sigma/к), C4LB231 (IgG1sigma/к) и C4LB232 (IgG1sigma/к) не активируют тромбоциты. Активацию тромбоцитов оценивали как % экспрессирующих PAC-1 и CD62p тромбоцитов от их общего числа. Активированные IC 5c8-IgG1 тромбоциты, активация которых блокировалась антителом к Fc $\gamma$ IIa, показывают, что активация тромбоцитов IC CD154/5c8-IgG1 опосредуется Fc $\gamma$ RIIa на тромбоцитах. ADP: положительный контроль. PBS: отрицательный контроль. Активацию тромбоцитов оценивали у пяти доноров. Результаты представлены как среднее по каждому эксперименту  $\pm$  CO.

На фиг. 4 показана поверхность взаимодействия между CD154 и C4LB89. Ароматические остатки F55, Y101 и Y102 в HCDR2 и HCDR3 участвуют в большинстве взаимодействий (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 59). Легкая цепь C4LB89 не участвует в связывании.

На фиг. 5 представлено двухмерное изображение эпитопных и паратопных остатков, идентифицированных по кристаллической структуре CD154 и C4LB89. Эпитопные остатки обведены эллипсом и показаны паратопные остатки в HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи (обозначены на фигуре как CDR1, CDR2 и CDR3). Антитело связывается одновременно с двумя мономерами CD154, A и B. Нумерация эпитопных остатков соответствует человеческому CD154 (SEQ ID NO: 1), а

нумерация паратопных остатков соответствует вариабельной области тяжелой цепи C4LB89 (SEQ ID NO: 59).

На фиг. 6А показано выравнивание остатков 1-180 CD154 человека (SEQ ID NO: 1, верхняя строка) и CD154 игрушки (SQ ID NO: 2, нижняя строка), демонстрирующее, что эпитопные остатки C4LB89 для CD154 человека и игрушки являются консервативными. Эпитопные остатки на мономере 1 CD154 подчеркнуты, а эпитопные остатки на мономере 2 подчеркнуты двойной линией.

На фиг. 6В показано выравнивание остатков 181-261 CD154 человека (SEQ ID NO: 1, верхняя строка) и CD154 игрушки (SQ ID NO: 2, нижняя строка), демонстрирующее, что эпитопные остатки C4LB89 для CD154 человека и игрушки являются консервативными. Эпитопные остатки на мономере 1 CD154 подчеркнуты, а эпитопные остатки на мономере 2 подчеркнуты двойной линией.

На фиг. 7 показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (sCD40L на фигуре) и IgG1/κ-антитела C4LB237 к CD154 не активируют тромбоциты, тогда как IC shCD154 и другого IgG1-антитела 5c8 активируют тромбоциты. Сами по себе антитела не оказывали влияния на активацию тромбоцитов, измеряемую как % экспрессирующих PAC-1 и CD62p тромбоцитов от общего их числа. ADP: положительный контроль. PBS: отрицательный контроль. Активацию тромбоцитов оценивали у пяти доноров. Результаты представлены как среднее по каждому эксперименту ± СО. n=4 в каждой группе.

На фиг. 8А показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (sCD40L на фигуре) и C4LB119 с заглушенным Fc активируют тромбоциты независимым от FcγRIIIa способом, тогда как IC shCD154 и антитела с доменами VH/VL C4LB119, экспрессированными на IgG1 (C4LB287), активировали тромбоциты FcγRIIIa-зависимым способом. ADP: положительный контроль. PBS: отрицательный контроль.

На фиг. 8В показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (sCD40L на фигуре) и C4LB94 с заглушенным Fc активируют тромбоциты независимым от FcγRIIIa способом, тогда как IC shCD154 и антитела с доменами VH/VL C4LB94, экспрессированными на IgG1 (C4LB289), активировали тромбоциты FcγRIIIa-зависимым способом. ADP: положительный контроль. PBS: отрицательный контроль.

На фиг. 8С показано, что иммунные комплексы (IC) shCD154 (sCD40L на фигуре) и C4LB83 с заглушенным Fc умеренно активируют тромбоциты, тогда как IC shCD154 и антитела с доменами VH/VL C4LB83, экспрессированными на IgG1 (C4LB288), активировали тромбоциты зависимым от FcγRIIIa способом. ADP: положительный контроль. PBS: отрицательный контроль.

#### Подробное описание изобретения

Все публикации, включенные в данное описание, включая, без ограничений, патенты и патентные заявки, включенные путем ссылок, являются частью настоящего документа, как если бы они были изложены непосредственно в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления и не являются ограничивающими. Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное специалисту среднего уровня в области, к которой имеет отношение изобретение.

Используемые в настоящем описании и в формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественные объекты, если иное не следует явно из контекста.

В настоящем документе описаны примеры способов и материалов, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут использованы следующие термины.

Термины "специфическое связывание" или "специфически связывает", или "связывает" относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, например около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, с  $K_D$ , которая по меньшей мере в сто раз менее значения  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, бычьим сывороточным альбумином (BSA), казеином). Константу диссоциации можно измерять стандартными процедурами. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, 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, макак), *Pan troglodytes* (шимпанзе) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная игрушка, игрушка). Тогда как моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термины "нейтрализация" или "нейтрализует", или "нейтрализующее антитело", или "антитело-антагонист", или "антагонист", или "антагонистическое" относятся к антителу или его антигенсвязывающему участку, которое частично или полностью ингибирует биологическую активность человеческого CD154. Антагонистические антитела можно выявлять с использованием анализов биологической активности CD154, описанных в настоящем документе. Антагонистическое антитело, специфически связы-

вающее человеческий CD154, может ингибировать биологическую активность человеческого CD154 приблизительно на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

CD154 означает человеческий белок CD154 (hCD154) (например, человеческий CD40L). Аминокислотная последовательность человеческого полноразмерного белка CD154 показана в SEQ ID NO: 1. Человеческий CD154 обнаруживается на клеточной мембране в виде мембранного белка II типа, а также присутствует в растворимой форме в плазме. Связанная с мембраной форма CD154 содержит остатки 1-261 последовательности SEQ ID NO: 1, причем трансмембранный домен расположен между остатками 23-46, а внеклеточный домен охватывает остатки 47-261. Растворимая форма человеческого CD154 (shCD154) образуется путем протеолитического процессинга связанной с мембраной формы и она содержит остатки 113-261 последовательности SEQ ID NO: 1) (аминокислотная последовательность shCD154 показана в SEQ ID NO: 4). Как связанный с мембраной, так и растворимый CD154 образует биологически активные тримеры. Обозначение CD154 охватывает различные формы CD154, включая мономерную, димерную, тримерную, связанную с мембраной и растворимую формы, а также варианты человеческого CD154 природного происхождения. Растворимый человеческий тример CD154 (тример shCD154) состоит из трех полипептидных цепей, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В контексте данного документа термин "антитела" подразумевается в широком значении и включает молекулы иммуноглобулинов, в том числе моноклональные антитела, включая мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, фрагменты антител, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий участок требуемой специфичности. "Молекулы целых антител" состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL также можно подразделять на области гипервариабельности, именуемые областями определяющими комплементарность (CDR), между которыми располагаются каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех сегментов CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминного конца к карбоксильному концу 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 вариативности 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, являющихся по своей структуре гипервариабельными, согласно определению Чотиа и Леска (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 участков. Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc et al., *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003. 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 иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно классифицируются на изоформы IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. 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 "фрагменты антитела" или "антигенсвязывающая часть антитела", относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий участок тяжелой цепи и/или легкой цепи, такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают хорошо известные фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), содержащие один домен VH. 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 одноцепочечными конструктами антител с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, таких как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международной патентной публикации

№ WO1998/44001, международной патентной публикации № WO1988/01649; международной патентной публикации № WO1994/13804; международной патентной публикации № WO1992/01047.

"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 биспецифических моноклональных антител, которые связываются с двумя отличными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, или моновалентным, бивалентным или мультивалентным. Биспецифическое антитело включено в термин "моноклональное антитело".

Термин "выделенное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, которое, по существу, не содержит других антител, имеющих отличную антигенную специфичность (например, выделенное антитело, специфически связывающее CD154, по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, отличные от CD154. 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%.

Термин "остатки по Чотиа" означает остатки VL и VH антител с нумерацией согласно Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273:927-48, 1997).

Термин "гуманизированные антитела" относится к антителам, у которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, а каркасы переменных областей получены из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. Гуманизированные антитела могут включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасная область может не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или генных последовательностей зародышевой линии.

Термин "человеческие антитела" относится к антителам, имеющим переменные области тяжелой и легкой цепей, в которых как каркасные области, так и антигенсвязывающие сайты получены из последовательностей человеческого происхождения. Если антитело содержит константную область или часть контрастной области, константная область также получена из последовательностей человеческого происхождения.

Человеческое антитело содержит переменные области тяжелой или легкой цепи, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если переменные области антитела получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем 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. Антитело человека может содержать 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, или обеими причинами. Как правило, антитело человека 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 человеческой зародышевой линии или перестроенным геном иммуноглобулина. В некоторых случаях антитело человека может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, 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 № WO2009/085462.

Выделенные гуманизированные антитела являются синтетическими. Антитела человека, хотя и полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека, могут быть созданы с применением таких систем, как фаговый дисплей, включая синтетические CDR и/или синтетические каркасы, или могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* для улучшения свойств антител, что приводит к получению антител, не экспрессирующихся зародышевой линией человека *in vivo*.

Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

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

При использовании в настоящем документе термин "эпитоп" относится к части антигена, с которой 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 смежных и/или несмежных аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае несмежного эпитопа аминокислоты из разных участков линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу

в 3-мерном пространстве благодаря сворачиванию молекулы белка.

Термин "паратоп" означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами антитела, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейных последовательностей аминокислот. Термины "паратоп легкой цепи" и "паратоп тяжелой цепи", или "аминокислотные остатки паратопа легкой цепи" и "аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи" означают остатки легкой и тяжелой цепей антитела, контактирующие, соответственно, с антигеном или в целом "остатки паратопа антитела" означают те аминокислоты антитела, которые контактируют с антигеном.

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 "мультиспецифический" относится к антителу, которое специфически связывает по меньшей мере два разных антигена или по меньшей мере два разных эпитопа в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может связываться, например, с двумя, тремя, четырьмя или пятью разными антигенами или разными эпитопами в пределах одного антигена.

Выражение "в комбинации с" означает, что лекарственные средства или терапевтические средства вводят субъекту, такому как человек, вместе в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термин "биологическая активность CD154" относится к любой активности, возникающей в результате связывания CD154 с его рецептором CD40. Биологическая активность CD154 может представлять собой, например, опосредованную CD154 активацию В-клеток CD40<sup>+</sup> или дендритных клеток (DC), или активацию нижележащих от CD40 сигнальных путей. Биологическую активность CD154 можно измерять с помощью хорошо известных методов или методов, описанных в настоящем документе, например путем измерения опосредованной CD154 пролиферации или активации В-клеток путем оценки повышения регуляции ICAM-1 или повышенной продукции цитокинов В-клетками, опосредованной CD154 активации DC путем оценки повышенной экспрессии CD80 и/или CD86 на поверхности или секреции цитокинов DC-клетками, или активации сигнального пути CD40 путем оценки с помощью анализов генов-репортеров, например измерения секреции секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) клетками, экспрессирующими SEAP под контролем индуцируемого NF-κB промотора.

Термин "вектор" обозначает полинуклеотид, способный к удвоению внутри биологической системы или который можно перемещать между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры отбора, функционирующие для облегчения удвоения или сохранения 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" означает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечная и одноцепочечная ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

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

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
Аспарат	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

#### Композиции настоящего изобретения

В настоящем изобретении предлагаются антагонистические антитела, специфически связывающее CD154 с высокой аффинностью и эффективно нейтрализующие биологическую активность CD154. Изобретение, по меньшей мере частично, основывается на том факте, что в отличие от текущего представления о том, что связывание антител, специфически связывающих CD154, с рецептором FcγRIIa на тромбоцитах приводит к активации и агрегации тромбоцитов и последующей тромбоэмболии, было обнаружено, что активация тромбоцитов также зависит от эпитопа на CD154, с которым связываются антитела. В настоящем изобретении было обнаружено, что антитела изобретения, связывающие определенный эпитоп на CD154 и способные задействовать FcγRIIa, не опосредуют активацию тромбоцитов. Кроме этого, антитела изобретения необязательно подвергаются изменению Fc в целях предотвращения запуска дополнительных нежелательных иммуностимулирующих функций. Следовательно, антитела изобретения могут иметь более благоприятные профили безопасности при клиническом применении по сравнению с существующими антителами, специфически связывающими CD154.

CD154 является мишенью при аутоиммунных реакциях, реакциях отторжения трансплантата и других связанных с иммунитетом заболеваниях у мышей, нечеловекообразных обезьян (NHP) и людей. В ряде клинических исследований фазы II было показано, что антитела, специфически связывающие CD154 эффективно блокируют активность CD154 *in vivo* и облегчают течение заболевания. Антагонисты CD154 отличаются от всех прочих терапевтических средств своим влиянием на иммунный ответ; они являются единственными терапевтическими средствами, способными вызвать функциональную иммунологическую толерантность, что продемонстрировано как на мышах, так и на обезьянах. На мышах течение практически всех аутоиммунных заболеваний можно эффективно облегчать антагонистами CD154 (Noelle et al., *Ann N Y Acad Sci* 815: 384-391, 1997; Mackey et al., *J Leukoc Biol* 63: 418-428, 1998; Noelle, *Agents Actions Suppl* 49: 17-22, 1998; Quezada et al., *Annu Rev Immunol* 22: 307-328, 2004), с наблюдением долговременной ремиссии.

В изобретении предлагается выделенное антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1.

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154, причем CD154 представляет собой гомотример, а антитело связывает первый мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 182-207 CD154 и второй мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 176-253 CD154, при этом нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

Примером такого антитела является антитело C4LB89. Поскольку переменные области антител C4LB235 и C4LB236 отличаются при сравнении от таковых C4LB89 на один аминокислотный остаток в LCDR2, и поскольку C4LB231 и C4LB232 имеют идентичные C4LB89 последовательности VH/VL, ожидается, что эти антитела также будут связывать тот же эпитоп CD154, что и C4LB89. Антитела, связывающие CD154 в пределах остатков 182-207 и 176-253, не способны активировать тромбоциты, несмотря на то, что способны взаимодействовать с рецепторами FcγR, включая FcγRIIa. Следовательно, эти антитела могут иметь улучшенный профиль безопасности по сравнению с другими антагонистическими антителами, специфически связывающими CD154.



В изобретении также предлагается антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее человеческий CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) и HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), причем необязательно

остаток S1 HCDR1 мутирован в A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T или V;  
 остаток I4 HCDR1 мутирован в M, L или V;  
 остаток S5 HCDR1 мутирован в A;  
 остаток S3 HCDR2 мутирован в A, T или V;  
 остаток P4 HCDR2 мутирован в V, T, L Q или E;  
 остаток N8 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток T9 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток N10 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток S1 HCDR3 мутирован в A или M;  
 остаток R2 HCDR3 мутирован в A, S, Q или K; и  
 остаток L7 HCDR3 мутирован в M.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), причем необязательно

остаток Q4 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток S5 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;  
 остаток S7 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;  
 остаток S8 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;  
 остаток A2 LCDR2 мутирован в S;  
 остаток N3 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток S4 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;  
 остаток L5 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;  
 остаток Q6 LCDR2 мутирован в E, D или N;  
 остаток S7 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;  
 остаток S3 LCDR3 мутирован в A;  
 остаток D4 LCDR3 мутирован в N;  
 остаток S5 LCDR3 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y; и  
 остаток I6 LCDR3 мутирован в A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T или V.

Кристаллическая структура комплекса антитела C4LB89 и CD154 показала, что антитело связывается с CD154 только по остаткам VH. Дополнительные анализы показали, что некоторые замены, показанные в табл. 19 и табл. 20, указанные выше в CDR антитела, не должны влиять на общую структуру комплекса и, следовательно, на характеристики антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно;  
 SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно;  
 SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно;  
 SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно;  
 SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно;  
 SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно;  
 SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно;  
 SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно; или  
 SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 44 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 49 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 50 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления иммунный комплекс антитела изобретения и растворимого человеческого CD154 (shCD154) не активирует тромбоциты, причем активация тромбоцитов измеряется по экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов.

Активация тромбоцитов является хорошо известным процессом, превращающим гладкий неприкрепленный тромбоцит в липкую покрытую шипами частицу, которая высвобождает и экспрессирует биологически-активные вещества и приобретает способность связывать белок плазмы фибриноген. Активация также может происходить в результате физической стимуляции высоким сдвиговым напряжением.

ем в жидкости, например, возникающим в месте критического сужения артерии (Quinn et al., 2005, Platelet Function: assessment, diagnosis, и treatment, Humana Press, pp. 3-20). Активация тромбоцитов приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, вызывающих усиление экспрессии на поверхности тромбоцитов Р-селектина и увеличение аффинности связывания фибриногена с интегринами  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . Следовательно, активацию тромбоцитов можно измерять путем измерения повышения экспрессии Р-селектина на поверхности или путем связывания зондирующего лиганда, например PAC-1, с интегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  на тромбоцитах, например, при помощи проточной цитометрии. Антитела изобретения не активируют человеческие тромбоциты, если антитело в комплексе с shCD154 не повышает экспрессию Р-селектина на поверхности или не увеличивает связывание зондирующего лиганда (например, PAC-1) с интегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  статистически достоверным образом в сравнении с индуцированной shCD154 экспрессией Р-селектина на поверхности или связыванием зондирующего лиганда (например, PAC-1) с интегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ .

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения имеет по меньшей мере одно из следующих свойств:

связывается с CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если  $K_D$  измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,03% полисорбата Р20 и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина;

ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

ингибирует опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF- $\kappa$ B минимального промотора интерферона- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-11}$  М или менее, или около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающее CD154, перекрестно реагирует с CD154 *Mascas fascicularis* (яванский макак) или CD154 *Callithrix jacchus* (игрунка).

Аффинность антитела к CD154 человека, яванского макака или игрушки можно определить экспериментально с использованием любого приемлемого способа. Такие способы могут включать применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности взаимодействия конкретного антитела с CD154 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ), как правило, выполняются 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" характеризует типичное стандартное отклонение при анализе. Например, типичное CO для значения  $K_D$ , равного  $1 \times 10^{-9}$  М, составляет до  $\pm 0,33 \times 10^{-9}$  М.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее.

При анализе пролиферации В-клеток  $1 \times 10^5$  В-клеток из миндалин человека можно культивировать со 100 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-21, 0,5 мкг/мл тримерного рекомбинантного растворимого человеческого CD154, экспрессированного в виде гибридного белка "лейциновая застежка", и с антителами к CD154 в диапазоне 0,000064-25 мкг/мл в конечном объеме 200 мкл/лунку. После 2 дней инкубации к культурам можно добавлять метил (-3Н)-тимидин (0,5 мКи/лунку) и можно определять влияние антител на пролиферацию человеческих В-клеток после инкубации в течение ночи.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения ингибирует индуцированную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF- $\kappa$ B минимального промотора интерферона- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения ингибирует индуцированную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF- $\kappa$ B минимального промотора интерферона- $\beta$  в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  от около  $2,1 \times 10^{-8}$  М до  $5,4 \times 10^{-10}$  М.

Можно использовать, например, клетки HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США). Человеческий CD154 можно предоставлять в виде гибридного белка тримерного раство-

римого CD154-лейциновая застежка. С использованием хорошо известных методов можно обнаруживать сигнал от секретируемой щелочной фосфатазы и рассчитывать значение  $IC_{50}$  для ингибирования.

В некоторых вариантах осуществления в гомотримере CD154 антитело изобретения связывает одновременно первый мономер CD154 и второй мономер CD154.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь остатков CD154 в первом мономере CD154 в пределах аминокислотных остатков 182-207 CD154 с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь остатков CD154 во втором мономере CD154 в пределах аминокислотных остатков 176-253 CD154 с SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает остатки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 и R207 в первом мономере CD154, причем нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает остатки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F253 во втором мономере CD154, причем нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

"В пределах" означает, что антитело связывает только остатки в пределах диапазонов аминокислот 182-207, 176-354 или 182-207 и 176-354.

Примером такого антитела является антитело C4LB89. Поскольку переменные области антител C4LB235 и C4LB236 отличаются при сравнении от таковых C4LB89 на один аминокислотный остаток в LCDR2, и поскольку C4LB231 и C4LB232 имеют идентичные с C4LB89 последовательности VH/VL, ожидается, что эти антитела также будут связывать тот же эпитоп CD154, что и C4LB89.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения связывает человеческий CD154 при помощи паратопных остатков, находящихся в VH антитела.

"Паратопный остаток" представляет собой остаток в VH или VL антитела, находящийся на расстоянии в пределах 4 Å от остатков CD154. Паратопные остатки можно идентифицировать по кристаллическим структурам комплекса антитела с CD154.

Примером антитела, которое связывает CD154 только при помощи паратопных остатков VH, без контакта VL с антигеном, является антитело, содержащее VH и VL антитела C4LB89. Поскольку переменные области C4LB235 и C4LB236 отличаются от таковых C4LB89 на один аминокислотный остаток в LCDR2, и поскольку C4LB231 и C4LB232 имеют последовательности VH/VL, идентичные с C4LB89, ожидается, что эти антитела также будут связывать CD154 при помощи только остатков VH. Антитела, которые связывают CD154 в пределах остатков 182-207 или 176-354 SEQ ID NO: 1 или остатков E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 и R207 в первом мономере CD154 и остатков T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F253 во втором мономере CD154 гомотримера CD154 не способны активировать тромбоциты, хотя и способны взаимодействовать с Fc $\gamma$ R, включая Fc $\gamma$ RIIa. Следовательно, эти антитела могут иметь улучшенный профиль безопасности по сравнению с другими антителами, специфически связывающими CD154.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 59, причем необязательно VH содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 59.

Антитело, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, или содержащее HCDR VH с SEQ ID NO: 59 или VH с SEQ ID NO: 59, связывает CD154 при помощи только VH антитела. Следовательно, VH с SEQ ID NO: 59 или VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, можно комбинировать с последовательностью переменной области легкой цепи (VL), а связывание полученного антитела с CD154 можно тестировать с использованием анализов, описанных в настоящем документе, с получением антитела, специфически связывающего CD154.

Например, VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, или VH с SEQ ID NO: 59, можно использовать для скринингового поиска доменов VL, способных образовывать двухдоменный специфический антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CD154. Такой скрининг может осуществляться с помощью методов скрининга с фаговым дисплеем, например с использованием иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в публикации PCT № WO1992/01047. При таком подходе индивидуальную колонию, содержащую либо клон цепи H, либо клон цепи L, например VH с SEQ ID NO: 59, используют для инфицирования всей библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), а полученный двухцепочечный специфический антигенсвязывающий домен отбирают в соответствии с методиками фагового дисплея, описанными в настоящем документе, и тестируют на связывание и антагонистическую активность в отношении CD154.

Альтернативно, VH с SEQ ID NO: 59 или VH, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID

NO: 17, 23 и 30, соответственно, можно комбинировать с доменами VL существующих антител к CD154 или описанных в настоящем документе антител к CD154, а полученное антитело тестируют на связывание и антагонистическую активность в отношении CD154.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, причем необязательно VL содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 66, 72 или 73, причем необязательно VL содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит по меньшей мере замену в области Fc, причем антитело не активирует человеческие тромбоциты.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения имеет сниженное связывание с FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa или FcγRIIIb.

"Сниженное связывание" означает уменьшенное связывание антител изобретения, имеющих по меньшей мере одну замену в области Fc, с рецептором FcγR по сравнению со связыванием родительского антитела, не имеющего этой замены, с тем же рецептором FcγR. "Сниженное связывание" может представлять собой по меньшей мере приблизительно 100-кратно, по меньшей мере приблизительно 500-кратно, по меньшей мере приблизительно 1000-кратно, по меньшей мере приблизительно 5000-кратно, по меньшей мере приблизительно 10000-кратно, или по меньшей мере приблизительно 20000-кратно сниженное связывание. На практике, антитела, показывающие "сниженное связывание" с конкретным FcγR, представляют собой антитела, имеющие статистически незначимую эффекторную функцию, опосредованную конкретным FcγR.

В некоторых вариантах осуществления, антитело изобретения содержит по меньшей мере одну замену в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замену L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S или P331S, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S или P331S в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замену V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S или P331S, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, антитело изобретения содержит замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S в области Fc, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 80, и легкую цепь с SEQ ID NO: 81.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 82, и легкую цепь с SEQ ID NO: 81.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 83, и легкую цепь с SEQ ID NO: 81.

SEQ ID NO: 80 (C4LB89 VH на IgG1sigma: C4LB231 HC)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYYGDLDYWGQGLTLVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL  
 LSPGK

SEQ ID NO: 81 (легкая цепь C4LB89 и C4LB231)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYANSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
 QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKLDSTYLSLSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 82 (C4LB89 VH на IgG1sigmaYTE)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYYGDLDYWGQGLTLVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDT  
 LYITREPEVTCVVDVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL  
 LSPGK

SEQ ID NO: 83 (C4LB89 VH на IgG2sigma)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYYGDLDYWGQGLTLVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 TVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQLDNLNGKE  
 YKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

К

Иммуноэффекторные свойства антител изобретения также могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, понижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. д., могут обеспечиваться и/или управляться модифицируемыми остатками в Fc, отвечающими за эти действия. Например, замены Fc V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 или V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S (международная патентная публикация № WO11/066501), или L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S можно вводить в антитела изобретения.

Связывание антител изобретения с FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIIIb можно оценивать с использованием рекомбинантных растворимых форм или ассоциированных с клетками форм рецепторов Fcγ. Например, можно применять прямые или непрямые измерения, например конкурентное связывание, для оценки относительных аффинностей и авидностей антител изобретения к различным FcγR. В одном примере анализа оценивают связывание тестируемого антитела с растворимым FcγR, захваченным на планшете, с использованием конкурентного связывания между 1 мкг/мл биотинилированного человеческого IgG1 и последовательных разведений тестируемого антитела в виде предкомплекса с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения имеет сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

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, NK-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 естественных внутриклеточных белков). Примеры эффекторных клеток для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и NK-клетки. Примерами клеток-мишеней являются клетки D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™) или T-клетки, экспрессирующие CD154.

"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 D1.1 Jurkat, экспрессирующих CD154, сконструированных с возможностью экспрессии GFP или другой маркирующей молекулы, в качестве клеток-мишеней. Соотношение эффекторные клетки: клетки-мишени может составлять, например, 4: 1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с тестовым антителом к CD154 или без него. 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<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> с помощью стандартных методов.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "CDC", относится к механизму индукции гибели клеток, в рамках которого 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 CD154, можно измерять, например, высевая клетки Jurkat в подходящую среду, добавляя в смесь антитела к CD154, 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) с помощью стандартных методов.

"Сниженная ADCC", "сниженная CDC" и "сниженная ADCP" представляет собой индуцированную антителами ADCC, CDC и/или ADCP, которая является статистически незначимой в стандартных анализах для измерения ADCC, CDC и/или ADCP, например в анализах, описанных в настоящем документе, или в анализах, описанных в патенте США № 8,871,204.

Антитела изобретения с желаемой аффинностью и профилем нейтрализации могут быть выбраны из библиотеки вариантов или фрагментов при помощи отбора методом пэннинга с CD154 человека или CD154 игрунки и необязательно с применением дополнительного созревания аффинности антител. В примере проведения операции пэннинга фаговые библиотеки можно подвергать пэннингу с CD154 игрунки. Альтернативно, антитела изобретения можно получать путем иммунизации мышей CD154 человека и/или CD154 игрунки и скрининга гибридом на связывание с человеческим CD154, с последующим оцениванием антагонистических свойств антител с использованием описанных в настоящем документе способов.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения конкурирует за связывание с CD154 с антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66.

Конкуренцию за специфическое связывание с CD154 между антителами изобретения, содержащими определенные последовательности VH и VL, можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных методов. Например, связывание меченых сложным эфиром NHS MSD Sulfo-Tag™ антител с CD154 в присутствии немеченого антитела можно анализировать твердофазным ИФА, или с помощью анализов Bioascore, или для демонстрации конкуренции с антителами настоящего изобретения можно использовать проточную цитометрию. Антитело конкурирует за связывание с CD154 с эталонным антителом (например, антителом, содержащим VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66), если антитело ингибирует связывание эталонного антитела с CD154 на 80% или более, например на 85% или более, на 90% или более, или 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления VH с SEQ ID NO: 59 можно комбинировать с VL любых антител к CD154, описанных в международных патентных публикациях № WO1993/08207, WO1994/10308,

WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860, WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 и WO2013/056068 с получением антагонистического антитела к CD154. Связывающую и антагонистическую активность полученных антител можно тестировать с использованием анализов и протоколов, описанных в настоящем документе.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно;  
SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно;  
SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно;  
SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно;  
SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно;  
SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно; или  
SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно;  
SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно;  
SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно;  
SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно;  
SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно;  
SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно; или  
SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с  
SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно;  
SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно;  
SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно;  
SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно;  
SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно;  
SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно;  
SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно;  
SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно; или  
SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 58 и VL с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 62 и VL с SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 63 и VL с SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно; или VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH и VL, причем VH содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH и VL, причем VL содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64, и VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, причем CDR определяются по Кабату, Чотиа и/или IMGT.

Варианты антител изобретения, содержащие аминокислотные последовательности VH или VL, приведенные в табл. 8, табл. 9 и табл. 14, находятся в пределах объема 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 отрицательного 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), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого 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 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определять, используя алгоритм, описанный в Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), встроенный в программу GAP из программного пакета GCG (доступен на сайте [http://\\_www\\_gcg\\_com](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 антитело изобретения содержит VH, которая по меньшей мере на 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична VH с SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64, причем антитело проявляет одно или более из следующих свойств:

иммунный комплекс антитела и shCD154 не активирует тромбоциты, причем активация тромбоцитов измеряется по экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов;

связывается с CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если  $K_D$  измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинности;

ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

ингибирует опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF- $\kappa$ B минимального промотора интерферона- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VL, которая по меньшей мере на 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, причем антитело проявляет одно или более из следующих свойств:

иммунный комплекс антитела и shCD154 не активирует тромбоциты, причем активация тромбоцитов измеряется по экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов;

связывается с CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если  $K_D$  измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинности;

ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

ингибирует опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF- $\kappa$ B минимального промотора интерферона- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH, которая по меньшей мере на 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична VH с SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64, и VL, которая по меньшей мере на 90%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, причем антитело проявляет одно или более из следующих свойств:

иммунный комплекс антитела и shCD154 не активирует тромбоциты, причем активация тромбоци-



тов измеряется по экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов;

связывается с CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если  $K_D$  измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинности;

ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

ингибирует опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF-κB минимального промотора интерферона-β (IFN-β) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40, со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 58.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 59.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 60.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 61.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 62.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 63.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 64.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 66.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 67.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 68.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 69.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 70.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 71.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 72.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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: 73.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 58 и VL с SEQ ID NO: 65, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 67, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 68, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения 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 одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пят-

надцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 63 и VL с SEQ ID NO: 70, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 71, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 72, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 73, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, показанные в табл. 8, табл. 9 и табл. 14, или их консервативные модификации, и причем антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антагонистических антител, специфически связывающих CD154.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно, и их консервативные модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно, и их консервативные модификации.

Антитела изобретения, содержащие определенные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 и их консервативные модификации,

проявляют одно или более из следующих свойств:

иммунный комплекс антитела и shCD154 не активирует тромбоциты, причем активация тромбоцитов измеряется по экспрессии P-селектина на поверхности тромбоцитов;

связываются с CD154 с константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если  $K_D$  измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинности;

ингибируют опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около

$2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

ингибируют опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF-κB минимального промотора интерферона-β (IFN-β) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40 со значением IC<sub>50</sub> около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

Термин "консервативная модификация" означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают в себя замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативными заменами являются такие, при которых аминокислота заменена остатком аминокислоты с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями четко определены и включают аминокислоты с кислотными 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). Более того, любой природный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (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 можно выполнять хорошо известными способами, например путем мутагенеза ПЦР (патент США № 4,683,195). Альтернативно, библиотеки вариантов можно создавать известными способами, например путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Thr, Trp). Характеристики полученных вариантов антител могут быть исследованы с применением анализов, описанных в настоящем документе.

Хотя варианты осуществления, приведенные в примерах, содержат пары переменных областей (одну для тяжелой цепи и одну для легкой цепи), специалист в данной области поймет, что альтернативные варианты осуществления могут содержать одиночные переменные области тяжелой или легкой цепи. Одиночный переменный участок может использоваться для скрининга переменных доменов, способных к формированию двухдоменного специфического антигенсвязывающего фрагмента, способного, например, специфически связываться с CD154. Такой скрининг может осуществляться с помощью методов фогового дисплея, например с применением иерархического дуального комбинаторного подхода, описанного в международной патентной публикации № WO1992/01047, как описано в настоящем документе.

Антитела изобретения можно получать с использованием различных технологий. Например, для создания моноклональных антител можно использовать метод гибридом по Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975. В методе гибридомы мышь или другое животное-хозяин, такое как хомяк, крыса или обезьяна, иммунизируют CD154 человека, игрушки или виванского макака, или фрагментами CD154, такими как растворимая форма CD154, с последующим слиянием клеток селезенки от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток immortalized гибридомы, отбирают на основе продукции антител с желаемыми качествами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Для продуцирования антител изобретения можно использовать различных животных-хозяев. Например, для создания антител можно использовать мышью Balb/c. Антитела, полученные от мышей Balb/c и от других животных, за исключением человека, можно гуманизировать с использованием различных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими. Примеры методик гуманизации, включающие выбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают пересадку CDR (патент США № 5,225,539), пересадку определяющей специфичность области (SDR) (патент США № 6,818,749), ремоделирование (Padlan, *Mol Immunol* 28:489-499, 1991), ремоделирование определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 20100261620), человеческую адаптацию (или адаптацию человеческих каркасов) (патентная публикация США № US2009/0118127), супер-гуманизацию (патент США № 7,709,226) и управляемую селекцию (Osbourne et al. (2005) *Methods* 36:61-68, 2005; патент США № 5,565,332). В этих способах CDR родительских антител переносят на человеческие каркасы, которые могут быть выбраны на основе их общей гомологии с родительскими каркасами, на основе информации о длине CDR каркаса, гомологии или канонической структуре, или их комбинации.

Гуманизированные антитела можно дополнительно оптимизировать для улучшения их селективно-

сти или аффинности к желаемому антигену путем включения остатков, поддерживающих измененный каркас, для сохранения аффинности связывания (обратных мутаций) с помощью таких методик, как описанные в международной патентной публикации № WO90/007861 и в международной патентной публикации № WO92/22653, или путем введения вариации в любую из 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), и они описаны, например, в международной патентной публикации № WO90/04036; патенте США № 6,150,584; международной патентной публикации № WO99/45962, международной патентной публикации № WO02/066630, международной патентной публикации № WO02/43478, Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856-9; Green et al. (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) *Exp. Med.* 188:483-95; 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; Brüggemann and Taussig (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458; международной патентной публикации № WO02/043478). Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких мышей можно разрушать или удалять, а в мышинный геном можно вставлять 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](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_harbourantibodies\\_com](http://_www_harbourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) и Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)).

Человеческие антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг конструируют с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные переменные 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 можно выделять, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей переменные области легкой и тяжелой цепей антитела, в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага рIX, как описано в Shi et al., *J Mol Biol* 397:385-96, 2010 и международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с CD154 человека, игрунки и/или яванского макака и полученные позитивные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов могут быть выделены Fab, а затем может быть выполнена экспрессия полноразмерных IgG. Такое применение способов фагового дисплея для выделения антител человека, например, описано в: патентах США № 5,223,409; 5,403,484; и 5,571,698, выданных Ladner et al.; патентах США № 5,427,908 и 5,580,717, выданных Dower et al.; патентах США № 5,969,108 и 6,172,197, выданных McCafferty et al.; и патентах США № 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 и 6,593,081, выданных Griffiths et al.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены любой приемлемой методикой, например продукцией 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 теле животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его участок.

Антитела изобретения могут быть человеческими или гуманизированными.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит каркас VH, полученный из человеческого гена зародышевой линии VH1\_1-69, VH4\_4-39, VH1\_1-02 или VH4\_4-59.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения содержит каркас VL, полученный из человеческого гена зародышевой линии VKIV\_B3, VKI\_O12 или VL3\_3R.

Антитела изобретения могут относиться к типу 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 сконструированными области VH, VL, VH и VL, константные области, каркас VH, каркас VL, или любая или все из шести CDR.

Антитела изобретения могут быть сконструированы путем пересадки CDR. Одну или более последовательностей CDR антител изобретения можно пересаживать на другую каркасную последовательность. Пересадку CDR можно осуществлять с использованием способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела изобретения содержат VH, содержащую HCDR1 с SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 или 21, HCDR2 с SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28, HCDR3 с SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 и VL, содержащую LCDR1 с SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42, LCDR2 с SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50, и/или LCDR3 с SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56 или

57, причем каркас VH не получен из VH1\_1-69, VH4\_4-39, VH1\_1-02 или VH4\_4-59, а каркас VL не получен из VKIV\_B3, VKI\_O12 или VL3\_3R. Каркасные последовательности для использования можно получать из общедоступных баз данных по ДНК или опубликованной литературы, включающей зародышевые генные последовательности антител. Например, зародышевая ДНК и кодированные белковые последовательности для человеческих генов переменных областей легкой и тяжелой цепей можно найти в международной информационной системе IMGT®, international ImMunoGeneTics information system® [http://\\_www-imgt\\_org](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 C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 и C4LB256. 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 № 6,180,370. Каркасные последовательности родительских и сконструированных антител можно дополнительно подвергать модификациям путем внесения мутаций в один 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 именуется "деиммунизацией" и описывается более подробно 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 внедрения 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 примерам замен, которые можно внедрять, относятся консервативные модификации, описанные выше. Более того, в пределах CDR, как правило, изменяют не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков.

Замены в Fc можно внедрять в антитело изобретения с целью модуляции периода полужизни антитела. Например, можно внедрять одну или более из замен M252Y, S254T и T256E с целью увеличения периода полужизни полученного антитела (Dall'Acqua et al., *J Biol Chem* 281:23514-240, 2006).

Кроме того, антитела изобретения могут быть модифицированы посттрансляционно за счет таких процессов, как гликозилирование, изомеризация, дегликозилирование или искусственная ковалентная модификация, такая как присоединение фрагментов полиэтиленгликоля (пэгилирование) или липидизация. Такие модификации могут происходить *in vivo* или *in vitro*. Например, антитела изобретения могут быть конъюгированы с полиэтиленгликолем (ПЭГилованы) с целью улучшения их фармакокинетических профилей. Конъюгация может быть выполнена методиками, 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; Alfthan et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003).

Антитела изобретения или их фрагменты, модифицированные с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биофизических характеристик, охвачены рамками объема настоящего изобретения. Стабильность антитела определяется рядом факторов, включая: (1) пространственную укладку отдельных доменов, влияющую на их естественную 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 основе кристаллической структуры антитела или, в определенных случаях, путем молекулярного моделирования, а влияние остатков на стабильность антитела можно тестировать путем создания и оценки вариантов, содержащих мутации по идентифицированным остаткам. 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 к нарушению третичной структуры и денатурации в растворе, а также 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 с помощью других методов (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 биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения представляет собой мультиспецифическое антитело.

Моноспецифические антитела изобретения, специфически связывающие CD154, можно конструировать в виде биспецифических антител, которые также входят в пределы объема настоящего изобретения. Из областей VL и/или VH антител изобретения с применением опубликованных способов можно конструировать одноцепочечные биспецифические антитела в виде структур, таких как конфигурации TandAb® (международная патентная публикация № WO1999/57150; патентная публикация США № 2011/0206672), или биспецифические scFV в виде структур, таких как описанные в патенте США № 5,869,620; международной патентной публикации № WO1995/15388, международной патентной публикации № WO1997/14719 или международной патентной публикации № WO2011/036460.

Из областей VL и/или VH антител изобретения можно конструировать биспецифические полноразмерные антитела, где каждое плечо антитела связывает отличный антиген или эпитоп. Такие биспецифические антитела могут быть получены путем модуляции взаимодействий СНЗ между тяжелыми цепями двух антител с образованием биспецифических антител с помощью технологий, таких как описанные в патенте США № 7695936; международной патентной публикации № WO2004/111233; патентной публикации США № 2010/0015133; патентной публикации США № 2007/0287170; международной патентной публикации № WO2008/119353; патентной публикации США № 2009/0182127; патентной публикации США № 2010/0286374; патентной публикации США № 2011/0123532; международной патентной публикации № WO2011/131746; международной патентной публикации № WO2011/143545; или патентной публикации США № 2012/0149876.

Например, биспецифические антитела можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух родительских моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO2011/131746. В этих способах два моноспецифических бивалентных антитела конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, способствующие стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи; таким образом, образуя биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубирования можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

К примерам мутаций СНЗ, которые можно использовать в первой тяжелой цепи и во второй тяжелой цепи биспецифического антитела, относятся K409R и/или F405L.

Дополнительные биспецифические структуры, в которые могут быть встроены области VL и/или VH антител изобретения, могут представлять собой, например, иммуноглобулины с двойным варибельным доменом (DVD) (международная патентная публикация № WO2009/134776) или структуры, включающие в себя различные димеризационные домены для соединения двух плеч антител с разной специфичностью, например "лейциновую застежку" или коллагеновые димеризационные домены (международная патентная публикация № WO2012/022811, патент США № 5932448; патент США № 6833441). DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; причем линкер является необязательным.

В изобретении также предлагается антагонистическое антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1, имеющее определенные последовательности VH и VL, причем VH антитела кодируется первым полинуклеотидом, а VL антитела кодируется вторым синтетическим полинуклеотидом. Полинуклеотид может быть комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (кДНК) и может иметь оптимизированные кодоны для экспрессии в приемлемом хозяине. Оптимизация кодоном является хорошо известной технологией.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие VH или VL антитела изобретения имеют последовательности с SEQ ID NO: 76, 77, 78 или 79.

SEQ ID NO: 76 (кодирующая VH в C4LB231)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGAC

CATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC

AAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCAACAGCCTGCAGAGCGGCGTGGCCAGCAGATTCA  
 GCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGC  
 CACCTACTACTGCCAGCAGAGCGACAGCATCCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA  
 ATCAAG

**SEQ ID NO: 77** (кодирующая VL в C4LB231)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGT  
 GTCTTGCAAGGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCTACGGCATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCA  
 GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAGCCCCATCTTCGGCAACACCAACTACGCCCAGA  
 AATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACGAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAG  
 CAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGCCGGTACTACGGCGACCTG  
 GACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT

**SEQ ID NO: 78** (кодирующая VH в C4LB191)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT  
 GAAGAAACCTGGCGCCAGCATGAAGGTGTCTTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCGACTAC  
 TACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCAGGCCAGGGACTGGAATGGGTGGGACGGTTCAACCCCA  
 ACAGCGGCGACACCAACGGCGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACACCCAG  
 CATCAGCACCGCCTACATGGAAC TGACCCGGCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACCACTGT  
 GCCAGAGAGGGCGAGCTGGCCGGCATCTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAG  
 TGTCAGC

**SEQ ID NO: 79** (кодирующая VL в C4LB191)

AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCCGTGTCTCTGGCCAGACCGCCAGCAT  
 CACCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTCTTGGAAACCACAGAAGCCCGGCCAG  
 AGCCCCGTGCTGGTGTCTACCAGGACCGGAAGAGGCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTACAGCG  
 GCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCCGA  
 CТАCTACTGCCAGGCCTGGGACAGCAGCACCGTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTG  
 CTG

В изобретении также предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий любую из переменных областей тяжелой цепи антитела, переменных областей легкой цепи антитела, тяжелых цепей антитела и/или легких цепей антитела изобретения. Некоторые примеры полинуклеотидов описаны в настоящем документе, однако другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют антитела изобретения, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Примерами полинуклеотидов являются, например, полинуклеотиды, содержащие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 76, 77, 78 и 79. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие VH или VL (или их фрагмент) антитела изобретения, могут быть функционально соединены 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 предлагается 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 переменные области легкой и/или тяжелой цепей антител изобретения, необязательно соединенные с константными областями, вставлены в экспрессионные векторы. Легкую и/или тяжелую цепи можно клонировать в одном или в разных экспрессионных векторах. ДНК-сегменты, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, могут быть функционально соединены 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 терминации 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.

Как правило, приемлемые экспрессионные векторы могут подвергаться репликации 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 гиромоцину, 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. Примеры промоторов для экспрессии в эукариотической клетке включают промоторные и энхансерные элементы генов легкой и/или тяжелой цепей иммуноглобулинов; немедленный ранний промотор цитомегаловируса; промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса; ранние и поздние промоторы SV40; промотор, присутствующий в длинных терминальных повторах ретровируса; промотор мышинового металлотионеина-I и различные тканеспецифические промоторы, известные в данной области. Выбор подходящего вектора и промотора вполне по силам специалисту среднего уровня в данной области.

Специалистам в данной области известны большие количества приемлемых векторов и промоторов; многие доступны на рынке для создания заявленных рекомбинантных конструкторов. Следующие векторы представлены в качестве примера. Бактериальные: 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: pWLeo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов изобретения. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую вводят 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, созданной 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.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*), такие бациллы, как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серрации и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Также для экспрессии используют другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, *S. cerevisiae*) и пихии являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами эукариотических клеток 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). К примеру клеточной линии миеломы человека относится U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologies, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

В изобретении также предлагается способ продуцирования антитела изобретения, включающий культивирование клетки-хозяина изобретения 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 процедурами, включая 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 на от около 80 до 85%, чистым по меньшей мере на от около 85 до 90%, чистым по меньшей мере на от около 90 до 95%, чистым по меньшей мере на от около 98 до 99% или более, например не содержащим загрязнителей, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т.д., отличные от заявленного антитела.

В изобретении также предлагается способ продуцирования антагонистического антитела, специфически связывающего CD154 с SEQ ID NO: 1, включающий

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 при условиях, в которых экспрессируются VL и VH, с образованием антитела; и



выделение антитела из клетки-хозяина или культуральной среды.

Полинуклеотиды, кодирующие определенные последовательности 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

Антагонистические антитела изобретения, специфически связывающие CD154, например антитела C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 и C4LB236, можно использовать для лечения и/или предотвращения любого состояния или заболевания, при котором антагонистические эффекты в отношении CD154 могут быть терапевтически эффективными и могут снижать симптомы заболевания. К примерам относится лечение аллергических, аутоиммунных, раковых, трансплантационных состояний, реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ), воспалительных и иных состояний, в особенности состояний, при которых индукция толерантности и/или подавление гуморального иммунитета является желательным с терапевтической точки зрения. К заболеваниям, которые можно лечить антителами изобретения, относятся иммуноопосредованные воспалительные заболевания или аутоиммунные заболевания, такие как артрит, системная красная волчанка (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, трансплантация, трансплантация почки, трансплантация кожи, трансплантация костного мозга, реакция "трансплантат против хозяина" (РТПХ), иммунная тромбоцитопения (ИТР), рассеянный склероз, тиреоидит, диабет I типа или атеросклероз.

Помимо простого блокирования взаимодействий CD154-CD40, анти-CD154-терапия приводит к индукции иммунологической толерантности (Gordon et al., *Diabetes* 47: 1199-1206, 1988); Markees et al., *Transplantation* 64: 329-335, 1997; Jarvinen et al., *Transplantation* 76: 1375-1379, 2003; Quezada et al., *Blood* 102: 1920-1926, 2003; Frleta et al., *J Immunother* 26: 72-84, 2003; Elster et al., *Transplantation* 72: 1473-1478, 2001; Benda et al., *Cell Transplantation* 11: 715-720, 2002; Wekerle and Sykes, *Annual review of medicine* 2001. 52: 353-370<sup>19</sup>; Camirand et al., *Transplantation* 73: 453-461, 2002).

В изобретении также предлагается способ лечения иммуноопосредованного воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела изобретения требующему этого субъекту в течение времени, достаточного для лечения иммуноопосредованного воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания.

В изобретении также предлагается способ лечения артрита, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела изобретения требующему этого субъекту в течение времени, достаточного для лечения артрита.

В некоторых вариантах осуществления артрит представляет собой ювенильный артрит, ревматоидный артрит, псориазический артрит, синдром Рейтера, анкилозирующий спондилит или подагрический артрит.

В изобретении также предлагается способ лечения волчанки, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела изобретения требующему этого субъекту в течение времени, достаточного для лечения волчанки.

В некоторых вариантах осуществления волчанка представляет собой системную красную волчанку (СКВ) или кожную красную волчанку (ККВ).

В некоторых вариантах осуществления субъект болен волчаночным нефритом.

В изобретении также предлагается способ лечения воспалительного заболевания кишечника, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела изобретения требующему этого субъекту в течение времени, достаточного для лечения воспалительного заболевания кишечника.

В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит.

Термины "лечение" или "лечить" означают терапевтическое лечение. Субъекты, требующие лечения, включают тех субъектов, у кого диагностировано расстройство или симптом расстройства. Субъекты, которых можно лечить, также включают тех, кто подвержен или восприимчив к расстройству, или тех, кому требуется профилактика расстройства. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Благоприятный клинический результат у субъекта, получившего лечение, включает в себя, например, сниженную пролиферацию В-клеток или дендритных клеток, снижение уровня провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, протеаз, иммуноглобулинов (в случаях, если несущая CD40 клетка представляет собой В-клетку), их комбинации, увеличенную продукцию противовоспалительных белков, уменьшение числа аутореактивных клеток, увеличение иммунной толерантности, ингибирование выживания аутореактивных клеток и/или уменьшение одного или более симптомов, опосредованных стимуляцией CD40-экспрессирующих клеток посредством CD154.

Клинический ответ можно оценивать при помощи скрининговых методик, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгенография, компьютерная томография (КТ), проточная цитометрия или цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), гистология, макропатология и биохимия крови, включая, без ограничений, изменения, определяемые методом твердофазного ИФА, радиоиммуноанализом (РИА), хроматографией и т.п.

Примеры антител, которые можно применять в способах изобретения, включают в себя области VH, VL, HCDR и/или LCDR, показанные в табл. 2, табл. 3, табл. 4, табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8, табл. 9, табл. 13 и табл. 14, и антитела C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 и C4LB236.

Способы изобретения можно применять для лечения субъекта в рамках любой классификации животных. Примеры субъектов, которых можно лечить, включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки и сельскохозяйственные животные.

Антитела изобретения также могут использоваться для получения лекарственного средства для проведения такого лечения, причем лекарственное средство получают для введения в дозировках, определенных в настоящем документе.

Антитела изобретения можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

Второй терапевтический агент может представлять собой любое известное средство терапии аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая любой агент или комбинацию агентов, польза которых известна, или которые использовались или в настоящее время используются для лечения аутоиммунных и воспалительных заболеваний. К таким средствам терапии и терапевтическим агентам относятся хирургия или хирургические процедуры (например, спленэктомия, лимфаденоэктомия, тироектомия, плазмаферез, лейкофорез, трансплантация клеток, тканей или органов, процедуры на кишечнике, перфузия органов и т. п.), радиационная терапия, такая терапия, как стероидная и нестероидная терапия, гормональная терапия, цитокиновая терапия, терапия дерматологическими агентами (например, агентами для местного применения, используемыми для лечения кожных патологий, таких как аллергии, контактный дерматит и псориаз), иммуносупрессорная терапия и терапия другими противовоспалительными моноклональными антителами.

Второй терапевтический агент может представлять собой кортикостероид, противомаларийное лекарственное средство, иммунодепрессант, цитотоксическое лекарственное средство или модулятор В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дефлазкорт, гидроксихлорохин, азатиоприн, метотрексат, циклофосфамид, микофенолата мофетил (ММФ), микофенолат натрия, циклоспорин, лефлуноמיד, такролимус, RITUXAN® (ритуксимаб) или BENLYSTA® (белimumаб).

В некоторых вариантах осуществления антитела изобретения вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом. К примерам вторых терапевтических агентов относятся кортикостероиды, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), салицилаты, гидроксихлорохин, сульфасалазин, цитотоксические препараты, иммуносупрессорные лекарственные средства, иммуномодулирующие антитела, метотрексат, циклофосфамид, мизорибин, хлорамбуцил, циклоспорин, такролимус (FK506; PrografM), микофенолата мофетил и азатиоприн (6-меркаптопурин), сиролimus (рапамуцин), дезоксипергуалин, лефлуноמיד и его малонитрилоамидные аналоги; антитела к CTLA4 и гибридные Ig, антитела к стимуляторам В-лимфоцитов (например, LYMPHOSTAT-BTM) и гибридные белки CTLA4-Ig (BLyS-Ig), антитела к CD80, анти-Т-клеточные антитела, такие как антитела к CD3 (ОКТ3), антитела к CD4, кортикостероиды, такие как, например, клобетазол, галобетазол, гидрокортизон, триамцинолон, бетаметазон, флуоцинол, флуоцинонид, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон; нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), такие как, например, сульфасалазин, содержащие мезаламин лекарственные средства (известные как агенты 5-ASA), цефекоксиб, диклофенак, этодолак, фенпрофен, флурбипрофен, ибупрофен, кетопрофен, меклофамат, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксапрозин, пироксикам, рофекоксиб, салицилаты, сулиндак и толметин; ингибиторы фосфодиэстеразы-4, антитела к TNF $\alpha$  REMICADE® (инфликсимаб), SIMPONI® (голимумаб) и HUMIRA® (адалimumаб), талидомид или его аналоги, такие как леналидомид.

Антитела изобретения можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом одновременно, последовательно или отдельно.

Эффективность лечения или РА можно оценивать, используя эффективность, измеренную по клиническим ответам, определяемым критериями Американского колледжа ревматологии (American College of Rheumatology), критериями Европейской лиги против ревматизма или любыми другими критериями. См., например, Felson et al. (1995) Arthritis Rheum. 38: 727-35 и van Gestel et al. (1996) Arthritis Rheum. 39: 34-40.

#### **Введение. Фармацевтические композиции**

В изобретении предложены фармацевтические композиции антагонистических антител, специфически связывающих CD154, и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения

возможно получение антител изобретения в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или несущей среде, вместе с которыми вводят активное соединение. 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% солевой раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация молекул или антител изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее около 0,5 мас.%, обычно по меньшей мере от около 1 и до 5 мас.%, 10 мас.%, 15 мас.%, 20 мас.%, 25 мас.%, 30 мас.%, 35 мас.%, 40 мас.%, 45 мас.% или 50 мас.%, и будет преимущественно выбираться на основании необходимой 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 сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Способом введения антител изобретения в способах изобретения может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие способы, известные специалисту, как хорошо известно в данной области.

Антитела изобретения можно вводить субъекту любым приемлемым способом, например парентерально путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно. В/в инфузию можно осуществлять, например, в течение 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 мин, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч.

Доза, которую вводят субъекту с иммуноопосредованным воспалительным заболеванием или аутоиммунным заболеванием, таким как ревматоидный артрит, достаточна для того, чтобы ослабить или по меньшей мере частично купировать заболевание, подлежащее лечению (терапевтически эффективное количество), и может иногда составлять от 0,005 мг/кг до около 100 мг/кг, например от около 0,05 мг/кг до около 20 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 20 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг 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/м<sup>2</sup>. Для лечения иммуноопосредованного воспалительного заболевания, такого как ревматоидный артрит, обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител изобретения 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, антитела изобретения можно вводить путем инфузии в дозе 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг или 16 мг/кг с интервалом в одну неделю в течение 8 недель, с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель, с последующим введением в дозе 8 или 16 мг/кг каждые четыре недели.

Антитела изобретения можно вводить в виде поддерживающей терапии, например один раз в неделю в течение периода 6 или более месяцев.

Например, антитела изобретения 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 одни из суток 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.

Антитела изобретения также можно вводить с профилактической целью, чтобы уменьшать риск развития иммуноопосредованного воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, такого как артрит или ревматоидный артрит, и/или для задержки проявления иммуноопосредованного воспалительного заболевания аутоиммунного заболевания.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получать с содержанием 1 мл стерильной забуференной водой и от около 1 нг до около 100 мг/кг, например от около 50 нг до около 30 мг/кг или, предпочтительнее, от около 5 мг до около 25 мг/кг антитела изобретения.

Например, фармацевтическую композицию, содержащую антитела изобретения, для введения пациенту с массой тела 80 кг путем внутривенной инфузии, можно готовить таким образом, чтобы она содержала около 200 мл стерильного раствора Рингера и от около 8 мг до около 2400 мг, от около 400 мг до около 1600 мг или от около 400 мг до около 800 мг антител изобретения. Способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA. "Терапевтически эффективное количество" антител изобретения, эффективное для лечения иммуноопосредованного воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания, можно определять стандартными методами исследования. К примеру, для помощи в определении оптимального диапазона доз можно использовать анализы *in vitro*. Дозу антител изобретения, которая может быть эффективной при лечении иммуноопосредованных воспалительных заболеваний или аутоиммунных заболеваний, таких как артрит или ревматоидный артрит, необязательно можно определять путем введения антител на соответствующих животных моделях, хорошо известных в данной области. Выбор конкретной эффективной дозы (например, посредством клинических испытаний) могут осуществлять специалисты в данной области на основании нескольких факторов. Такие факторы включают: подлежащее лечению или профилактике заболевание, отмеченные симптомы, массу тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалисту факторы. Точная доза, предназначенная для применения в составе, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания и должна определяться на основании решения медработника и состояния каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривых "доза-ответ", полученных в тестовых системах *in vitro* или животных моделей. Антитела изобретения можно тестировать на предмет их эффективности и эффективной дозы с применением любой из моделей, описанных в данном документе.

Антитела изобретения могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в приемлемом носителе перед использованием. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо известные методики лиофилизации и восстановления.

Антиидиотипические антитела

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

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 58 и VL с SEQ ID NO: 65.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 60 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 61 и VL с SEQ ID NO: 68.

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

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 63 и VL с SEQ ID NO: 70.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 64 и VL с SEQ ID NO: 71.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 72.

В изобретении также предлагается антиидиотипическое антитело, специфически связывающее антитело, содержащее VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 73.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, распознающим антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или неблокирующим антиген. Блокирующее антиген Id-антитело можно использовать для обнаружения свободного антитела в образце (например, описанного в настоящем документе антитела к CD154 изобретения). Неблокирующее Id-антитело можно использовать 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 может использоваться как иммуноген для индуцирования 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. Анти-Id-антитела можно подвергать вариациям (полу-

чая, тем самым, варианты анти-Id-антител) и/или получению производных при помощи любой приемлемой методики, например описанных в других частях настоящего документа применительно к антителам, специфически связывающим антитела к HLA-DR.

#### Иммуноконъюгаты

Термин "иммуноконъюгат" означает антитело изобретения, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами. В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения конъюгировано с одним или более цитотоксическими агентами. К примерам таких цитотоксических агентов относятся 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 радиоактивные изотопы.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело изобретения конъюгировано с одним или более лекарственных средств, например с майтанзиноидом (см., например, патенты США № 5,208,020, 5,416,06)); ауристатином, например монометилауристатиновыми лекарственными группами DE и DF (MMAE и MMAF) (см., например, патенты США № 5,635,483, 5,780,588, и 7,498,298), доластатином, калихеамицином или их производными (см., например, патенты США № 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 и 5,877,296; Hinman et al., (1993) *Cancer Res* 53:3336-3342 и Lode et al., (1998) *Cancer Res* 58:2925-2928); антрациклином, например дауномицином или доксорубицином (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 № 6,630,579), метотрексатом, виндезином, таксаном, таким как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело изобретения, конъюгированное ферментативно активным токсином или его фрагментом, таким как А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *omordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления антитело изобретения конъюгировано с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов существуют разнообразные радиоактивные изотопы. К примерам относятся At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 и радиоактивные изотопы Lu. При использовании для детекции радиоконъюгата, он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например tc99m или I123, или спиновую метку для визуализации с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также именуемой магнитно-резонансной томографией, МРТ), например снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

Конъюгаты антитела изобретения и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных агентов для соединения белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидозфиров (таких как диметилладипимидат HQ), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фторными группами (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., (1987) *Science* 238: 1098. Меченный углеродом-14 I-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклида с антителом. См., например, WO94/11026. Линкер может представлять собой "отщепляемый линкер", упрощающий высвобождение цитотоксического лекарственного средства в клетке. Например, можно использовать кислотнo-лабильный линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотоллабильный линкер, диметилловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., (1992) *Cancer Res* 52: 127-131; патент США № 5,208,020).

Иммуноконъюгаты или ADC можно получать с кросс-линкерными реагентами, такими как BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые имеются в продаже (например, от Pierce Biotechnology, Inc., г. Рокфорд, штат Иллинойс, США).

В изобретении также предлагается иммуноконъюгат, содержащий антитело, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO: 1 изобретения, связанное с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

### Дополнительные варианты осуществления изобретения

Ниже изложены некоторые дополнительные варианты осуществления изобретения в соответствии с описаниями, представленными в других частях настоящего документа. Элементы из вариантов осуществления изобретения, изложенных выше, описанные как связанные с изобретением, раскрытым в настоящем документе, также относятся ко всем и каждому без исключения из этих дополнительно пронумерованных вариантов осуществления.

1) Выделенное антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее человеческий CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYA-QKFQG) и HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), причем необязательно

- a) остаток S1 HCDR1 мутирован в A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T или V;
- b) остаток I4 HCDR1 мутирован в M, L или V;
- c) остаток S5 HCDR1 мутирован в A;
- d) остаток S3 HCDR2 мутирован в A, T или V;
- e) остаток P4 HCDR2 мутирован в V, T, L Q или E;
- f) остаток N8 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;
- g) остаток T9 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;
- h) остаток N10 HCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;
- i) остаток S1 HCDR3 мутирован в A или M;
- j) остаток R2 HCDR3 мутирован в A, S, Q или K; и k) остаток L7 HCDR3 мутирован в M.

2) Антитело по п. 1, содержащее определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), причем необязательно

- a) остаток Q4 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W или Y;
- b) остаток S5 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;
- c) остаток S7 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;
- d) остаток S8 LCDR1 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;
- e) остаток A2 LCDR2 мутирован в S;
- f) остаток N3 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W или Y;
- g) остаток S4 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;
- h) остаток L5 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W или Y;
- i) остаток Q6 LCDR2 мутирован в E, D или N;
- j) остаток S7 LCDR2 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y;
- k) остаток S3 LCDR3 мутирован в A;
- l) остаток D4 LCDR3 мутирован в N;
- m) остаток S5 LCDR3 мутирован в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W или Y; и
- n) остаток 16 LCDR3 мутирован в A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T, V.

3) Антитело по варианту осуществления 1 или 2, содержащее HCDR1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYA-QKFQG), HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), LCDR1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

4) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-3, содержащее

- a) VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66; или
- b) тяжелую цепь с SEQ ID NO: 80 и легкую цепь с SEQ ID NO: 81.

5) Выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающее растворимый человеческий CD154 (shCD154) с SEQ ID NO: 4.

6) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-5, содержащее по меньшей мере одну замену в области Fc.

7) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-6, которое не активирует человеческие тромбоциты.

8) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-7, в котором антитело связывается с shCD154 с константой диссоциации  $K_D$  около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-11}$  М или менее, или около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, причем  $K_D$  измерена с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинностей.

9) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-8, в котором антитело ингибирует опосредованную shCD154 пролиферацию человеческих В-клеток со значением  $IC_{50}$  от около  $7,0 \times 10^{-11}$  М до около  $6 \times 10^{-10}$  М.

10) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-9, в котором антитело ингибирует опосредованную shCD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF-κB минимального промотора интерферона-β (IFN-β) в клетках

НЕК293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40 со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

11) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-10, в котором антитело конкурирует за связывание с shCD154 с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем VH содержит последовательность SEQ ID NO: 59, а VL содержит последовательность SEQ ID NO: 66.

12) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-11, в котором антитело содержит аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) и 3 (HCDR3) VH с SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 или 64, необязательно имеющее одну, две или три консервативные аминокислотные замены в HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, причем HCDR определяются по системе Кабата, Чотиа или IMGT.

13) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-12, в котором антитело содержит аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) и 3 (LCDR3) VL с SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 или 73, необязательно имеющее одну, две или три консервативные аминокислотные замены в LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, причем LCDR определяются по системе Кабата, Чотиа или IMGT.

14) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-13, содержащее аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно, и их консервативные модификации;
- b) SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и их консервативные модификации;
- c) SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно, и их консервативные модификации;
- d) SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно, и их консервативные модификации;
- e) SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно, и их консервативные модификации;
- f) SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно, и их консервативные модификации или
- g) SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно, и их консервативные модификации.

15) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-10, содержащее аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно, и их консервативные модификации;
- b) SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно, и их консервативные модификации;
- c) SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно, и их консервативные модификации;
- d) SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно, и их консервативные модификации;
- e) SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно, и их консервативные модификации;
- f) SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно, и их консервативные модификации;
- g) SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно, и их консервативные модификации;
- h) SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно, и их консервативные модификации или
- i) SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно, и их консервативные модификации.

16) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-15, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 16, 24 и 31, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 18, 25 и 32, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 19, 26 и 33, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 20, 27 и 34, соответственно или
- g) SEQ ID NO: 21, 28 и 35, соответственно.

17) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-16, содержащее аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно;
- b) SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно;
- c) SEQ ID NO: 38, 45 и 53, соответственно;
- d) SEQ ID NO: 39, 46 и 54, соответственно;
- e) SEQ ID NO: 40, 47 и 55, соответственно;
- f) SEQ ID NO: 41, 47 и 56, соответственно;
- g) SEQ ID NO: 42, 48 и 57, соответственно;
- h) SEQ ID NO: 37, 49 и 52, соответственно или
- i) SEQ ID NO: 37, 50 и 52, соответственно.

18) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-17, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 16, 22 и 29, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 36, 43 и 51, соответственно.

19) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-17, содержащее HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 37, 44 и 52, соответственно.





или пятнадцать аминокислотных замен.

38) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-37, которое содержит по меньшей мере одну замену в области Fc.

39) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-38, в котором по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

40) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-38, в котором по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

41) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-40, в котором антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

42) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-41, в котором все паратоппные остатки антитела находятся в VH.

43) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-42, в котором антитело одновременно связывает первый мономер CD154 и второй мономер CD154 растворимого тримера человеческого CD154.

44) Антитело по варианту осуществления 43, в котором антитело связывает по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь остатков CD154 в первом мономере CD154 в пределах аминокислот 182-207 CD154 в SEQ ID NO: 1, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

45) Антитело по варианту осуществления 43 или 44, в котором антитело связывает по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь остатков CD154 во втором мономере CD154 в пределах аминокислот 176-253 CD154 в SEQ ID NO: 1, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

46) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 43-45, в котором антитело связывает остатки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 и R207 в первом мономере CD154, причем нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

47) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 43-46, в котором антитело связывает остатки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F353 во втором мономере CD154, причем нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 1.

48) Биспецифическая молекула, содержащая антитело или его антигенсвязывающий участок, по любому из вариантов осуществления 1-47, связанная со второй антигенсвязывающей молекулой, имеющей другую специфичность связывания.

49) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 или биспецифическая молекула по 48, которая

а) в иммунном комплексе с shCD154 не активирует человеческие тромбоциты;

б) связывается с shCD154 с константой диссоциации  $K_D$  около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее;

с) ингибирует опосредованную shCD154 пролиферацию В-клеток человека; или

д) ингибирует биологическую активность CD154 в анализе гена-репортера NF-κB-SEAP.

50) Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий участок по любому одному из вариантов осуществления 1-47, связанный с терапевтическим агентом или визуализирующим агентом.

51) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по варианту осуществления 1-47 и фармацевтически приемлемый носитель.

52) Полинуклеотид, кодирующий VH антитела, VL антитела или VH антитела и VL антитела по любому одному из вариантов осуществления 1-47.

53) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 52.

54) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 53.

55) Способ продуцирования антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 54 в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцированного клеткой-хозяином.

56) Антитело по любому из вариантов осуществления 1-47 или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 51 для применения в лечении аутоиммунного заболевания или иммуноопосредованного воспалительного заболевания.

57) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении таких заболеваний как артрит, системная красная волчанка (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, трансплантация, трансплантация почки, трансплантация кожи, трансплантация костного мозга, реакция "трансплантат против хозяина" (РТПХ), иммунная тромбоцитопения (ИТР), рассеянный склероз, тиреоидит, диабет I типа или атеросклероз.

58) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении ревматоидного артрита.

59) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении вол-

чанки.

60) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении при трансплантации.

61) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении воспалительного заболевания кишечника.

62) Антитело по любому одному из вариантов осуществления 1-47 для применения в лечении по любому из вариантов осуществления 56-61 в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

63) Антитело по варианту осуществления 62, в котором второй терапевтический агент представляет собой нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), салицилаты, гидроксихлорохин, сульфасалазин, кортикостероиды, цитотоксические лекарственные средства, иммуносупрессорные лекарственные средства и/или антитела.

В изобретении также предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий участок, специфически связывающее человеческий CD154 с SEQ ID NO: 1, содержащее определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

В изобретении также предлагается выделенное антагонистическое антитело, специфически связывающее растворимый человеческий CD154 (shCD154) с SEQ ID NO: 4, содержащее HCDR1 с SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), LCDR1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с shCD154 с константой диссоциации  $K_D$  около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $5 \times 10^{-11}$  М или менее, или около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее, причем  $K_D$  измерена с использованием системы ProteOn XPR36 с применением плана эксперимента, описанного в примере 1, для измерения аффинности.

В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует опосредованную shCD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  от около  $7,0 \times 10^{-11}$  М до около  $6 \times 10^{-10}$  М.

В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует опосредованную shCD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF-κB минимального промотора интерферона- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40 со значением  $IC_{50}$  около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1, необязательно содержащему замены в тяжелой цепи L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66, и относится к изотипу IgG1, необязательно содержащему замены в тяжелой цепи L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66 и относится к изотипу IgG1/κ, содержащему замены в тяжелой цепи L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG2, необязательно содержащему замены в тяжелой цепи V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66 и относится к изотипу IgG2/κ, содержащему замены в тяжелой цепи V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 80 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 80 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении аутоиммунного заболевания.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении иммуноопосредованного воспалительного заболевания.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении артрита.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении системной красной волчан-

ки.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении воспалительного заболевания кишечника.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при терапии при трансплантации.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например, при терапии при трансплантации почки.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при терапии при трансплантации кожи.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при терапии при трансплантации костного мозга.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении реакции "трансплантат против хозяина".

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении иммунной тромбоцитопении.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении рассеянного склероза.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении тиреоидита.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении диабета I типа.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении атеросклероза.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении ревматоидного артрита.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении болезни Крона.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении язвенного колита.

Антитело приемлемо для применения в терапии, например при лечении воспалительного заболевания кишечника в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

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

Пример 1. Материалы и способы.

Получение используемых белков.

Поскольку эндогенный CD154 участвует в передаче сигнала в качестве тримера, рекомбинантный CD154 экспрессировали разными способами для получения функционального рекомбинантного тримера. Растворимый человеческий CD154 (shCD154; SEQ ID NO: 4), растворимый CD154 Callithrix jacchus (обыкновенная игрунка; в настоящем документе именуемая игрункой) (smCD154; SEQ ID NO: 5) или растворимый CD154 Macaca fascicularis (макак-крабоед, в настоящем документе именуемый яванским макаком) (scCD154; SEQ ID NO: 6) клонировали и экспрессировали в качестве слияний с His6 (SEQ ID NO: 10) (shCD154-his, SEQ ID NO: 7; smCD154-his, SEQ ID NO: 8; scCD154-his, SEQ ID NO: 9) или в качестве гибридного белка с "лейциновой застежкой" (ILZ) (SEQ ID NO: 11) (shCD154-ILZ, SEQ ID NO: 12; smCD154-ILZ, SEQ ID NO: 13; scCD154-ILZ, SEQ ID NO: 14). Клонирование, экспрессию и очистку белков выполняли с использованием стандартных способов. Слияния с His и ILZ представляли собой преимущественно тримеры. Белки smCD154 и smCD154-ILZ были биотинилированы с использованием EZ-Link™ сульфо-NHS-LC-биотин и набора для включения меток (Thermo, кат. № 21327), успешность биотинилирования анализировали при помощи НАВА-авидинового анализа (Thermo, кат. № 46610) и Octet. Клетки, экспрессирующие человеческий CD40 (SEQ ID NO: 15), использовали в некоторых анализах. В некоторых анализах использовали клетки D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™), эндогенно экспрессирующие человеческий CD154.

Человеческий CD154; SEQ ID NO: 1

```
MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRRLDKIEDERNL
HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIA
AHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA
PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGT
GFTSFGLLKL
```

CD154 игрушки; SEQ ID NO: 2

MIETYNQPVPRSAATGPPVSMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNL  
 HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKKKENSFEMQKGDQNPQIA  
 AHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA  
 PFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGIFELQPGASVFNVTDPQVSHGT  
 GFTSFGLLKL

CD154 яванского макака; SEQ ID NO: 3

MIETYNQVPSRSAATGLPVRMKIFMYLLTI FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNL  
 HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKKKENSFEMQKGDQNPQIA  
 AHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA  
 PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGT  
 GFTSFGLLKL

shCD154; SEQ ID NO: 4

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYI  
 YAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGA  
 SVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

smCD154; SEQ ID NO: 5

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYI  
 YAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGIFELQPGA  
 SVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154; SEQ ID NO: 6

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYI  
 YAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS IHLGGVFELQPGA  
 SVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

shCD154-his; SEQ ID NO: 7

GSHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK  
 QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS I  
 HLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

smCD154-his; SEQ ID NO: 8

GSHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK  
 QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS I  
 HLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154-his; SEQ ID NO: 9

GSHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK  
 QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS I  
 HLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL

His6; SEQ ID NO: 10

HHHHHH

ILZ; SEQ ID NO: 11

RMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGER

shCD154-ILZ; SEQ ID NO: 12

GSNNHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQI  
AAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQ  
APFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHG  
TGFTSFGLLKL

smCD154-ILZ; SEQ ID NO: 13

GSNNHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQI  
AAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQ  
APFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQIHLGGIFELQPGASVFNVTDPQSQVSHG  
TGFTSFGLLKL

scCD154-ILZ; SEQ ID NO: 14

GSNNHHHHGGGSRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQI  
AAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQ  
APFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQSQIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHG  
TGFTSFGLLKL

человеческий CD40; SEQ ID NO: 15

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCSCSLCQPGKLVSDCTEFTETEC  
LPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCEEHGHCTSEACESCVLHR  
SCSPGFVGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQAGTNKTDVVCG  
PQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEIFPDDLPGSNTAAPV  
QETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQ

#### Измерения аффинности.

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 модифицированной слоем альгинатного полимера поверхностью чипа GLC (BioRad, кат. № 176-5011) с использованием инструкций производителя по проведению аминного связывания. Иммуобилизовали приблизительно 4700 RU (отвечающих единиц) исследуемых антител. Кинетические эксперименты выполняли при 25°C в подвижном буферном растворе (DPBS+0,03% полисорбат P20+100 мкг/мл BSA). Для выполнения кинетических экспериментов захватывали 100 RU антител, с последующим выполнением инъекций анализов (shCD154-his и smCD154-his) с концентрациями в диапазоне от 0,391 нМ до 100 нМ (в 4-кратном последовательном разведении). Фазу ассоциации отслеживали в течение 3 мин при 50 мкл/мин, с последующим 15-минутным прогоном буферного раствора (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали двумя 18-секундными импульсами 100 мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (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 инъекцию буферного раствора вместо инъекций анализов. Кинетический анализ данных выполняли, используя модель связывания Ленгмюра 1: 1.

#### Индукцированная CD154 активация клеток Ramos.

Способность антител к CD154 ингибировать активацию клеток Ramos оценивали, используя CD54 в качестве маркера активации клеток. Клетки Ramos (клетки лимфомы Беркитта, ATCC® CRL-1596™), культивированные согласно протоколу поставщика, высевали в 96-луночный планшет с V-образным дном лунок при плотности  $2,0 \times 10^5$  клеток/лунку в полную ростовую среду по 100 мкл/лунку. Тестируемые антитела в концентрациях 0,2, 2 или 20 мкг/мл предварительно инкубировали с 40 нг/мл smCD154-his в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) и впоследствии добавляли их к клеткам. Планшет накрывали и инкубировали в течение ночи (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). На следующий день центрифугировали анализируемый планшет и удаляли истощенную ростовую среду. Полученный осадок клеток промывали холодным PBS/2% FBS и впоследствии клетки окрашивали меченным PE антителом к CD54 (ICAM-1) или подходящим изотипическим контролем в течение 1 ч при 4°C. Клетки промывали холодным PBS/2% FBS, ресуспендировали в 100 мкл/лунку холодного PBS/2% FBS и измеряли флуоресцентный сигнал (желтый канал) на проточном цитометре. Антитела считали антагонистами при выполнении следующих критериев: % активности относительно антитела 5C8 > 5% активности 5C8, где % активности представляет собой нормализованное процентное значение ингибирования относительно 5C8 при наибольшей

протестированной концентрации.

Анализ гена-репортера NF-κB-SEAP.

Способность антител к CD154 ингибировать индуцированные CD154 сигнальные пути нижележащие от CD40 оценивали с использованием клеток HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen), сконструированных с возможностью экспрессии человеческого CD40 и трансфицированных геном-репортером секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), находящимся под контролем индуцируемого NF-κB промотора (минимального промотора IFN-β). Клетки стимулировали CD154 человека или яванского макака, либо клетками Jurkat. Клетки HEK-Blue™ CD40L культивировали в соответствии с протоколом поставщика и все анализы активности выполняли в DMEM с добавлением 10% инактивированной нагревом эмбриональной бычьей сыворотки и 1X GlutaMax. Клетки высевали в 96-луночные планшеты для культивирования ткани с плотностью клеток 2,5 или  $5 \times 10^4$  клеток на лунку в объеме 100 мкл и инкубировали в течение ночи (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). На следующий день 4X растворы shCD154-His или shCD154-ILZ, либо клеток D1.1 Jurkat предварительно инкубировали с 4X растворами антител к CD154 (в подходящих концентрациях) в соотношении 1: 1 с получением 2X растворов смесей предкомплексов CD154:антитело. Смеси CD154:антитело инкубировали при КТ в течение 1 ч, а смесь D1.1 Jurkat:mAb инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. В конце периода инкубации предкомплексов в 96-луночный аналитический планшет, содержащий клетки HEK-Blue™ CD40L, добавляли по 100 мкл/лунку 2X растворов предкомплексов; конечный объем при анализе составлял 200 мкл/лунку с конечными концентрациями CD154 80 нг/мл shCD154-His или 40 нг/мл shCD154-ILZ, или  $2,5-6,0 \times 10^4$  клеток D1.1 Jurkat. После 16-24 ч периода обработки (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) супернатанты анализировали на активность фосфатазы (SEAP) путем измерения поглощения (650 нм) для супернатантов, введенных в концентрации 40 мкл/лунку и инкубированных с 160 мкл/лунку QUANTI-Blue™ (InvivoGen) при 37°C в течение 30-60.

Анализ опосредованной клетками Jurkat активации дендритных клеток.

Способность антител к CD154 ингибировать опосредованную клетками Jurkat активацию дендритных клеток (DC) оценивали путем измерения снижения продукции различных цитокинов DC. Человеческие моноциты (Biologic Specialties) культивировали с 50 нг/мл IL-4 и GM-CSF в течение шести дней. На 3 день клетки заменяли среду на свежую (с IL-4 и GM-CSF). Незрелые клетки DC (iDC) (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>low</sup> CD83<sup>-</sup>) использовали в анализах с применением клеток на 6 день. Инкубировали  $2,5 \times 10^5$  клеток D1.1 Jurkat (облученных дозой 1000 рад) с 0,000064-25 мкг/мл антител к CD154 в течение 15-20 мин и впоследствии сокультивировали с  $2,5 \times 10^4$  iDC в конечном объеме 200 мкл/лунку в 96-луночном круглодонном планшете. После 48 часов инкубации собирали супернатанты для анализа на цитокины.

Анализ опосредованной клетками Jurkat активации В-клеток.

Способность антител к CD154 ингибировать опосредованную клетками Jurkat активацию В-клеток оценивали путем анализа влияния антител на пролиферацию В-клеток. Сокультивировали  $1 \times 10^5$  клеток D1.1 Jurkat (облученных дозой 5000 рад) с  $1 \times 10^5$  В-клеток из человеческих миндалин в присутствии IL-21 (100 нг/мл) и 0,0077 нг/мл - 15 мкг/мл антител к CD154 в конечном объеме 200 мкл/лунку в 96-луночном круглодонном планшете. После 2 дней инкубации к культурам добавляли метил (-3H)-тимидин (0,5 мкКюри/лунку) и определяли пролиферацию человеческих В-клеток после инкубации в течение ночи.

Анализ опосредованной CD154 активации В-клеток.

Способность антител к CD154 ингибировать опосредованную рекомбинантным CD154 активацию В-клеток оценивали на В-клетках человека или яванского макака. Культивировали  $1 \times 10^5$  В-клеток из человеческих миндалин или клеток селезенки яванского макака с 100 нг/мл rhIL-21, 0,5 мкг/мл shCD154-ILZ и 0,0077 нг/мл - 15 мкг/мл антител к CD154 в конечном объеме 200 мкл/лунку в 96-луночном круглодонном планшете. После 2 дней инкубации к культурам добавляли метил (-3H)-тимидин (0,5 мкКюри/лунку) и определяли пролиферацию человеческих В-клеток после инкубации в течение ночи.

Пример 2. Выделение антител к CD154 из библиотек фаговых дисплеев.

Связывающие CD154 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 № WO2009/085462; патентной публикации США № US2010/0021477). 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 минигеном IGHJ-4 посредством петли H3, а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии O12 (IGKV1-39\*01), L6 (IGKV3-11\*01), A27 (IGKV3-20\*01) и B3 (IGKV4-1\*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации выбирали положения варьируемых областей легкой и тяжелой цепи 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, появляющимися 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 объединяли с четырьмя легкими цепями зародышевой линии или библиотеками легких цепей зародышевых линий для создания 12 уникальных комбинаций VH:VL для экспериментов по пэннингу на smCD154 или клеток, экспрессирующих полно-размерный CD154 яванского макака.

Библиотеки подвергали пэннингу относительно либо полноразмерного CD154 яванского макака (SEQ ID NO: 3), стабильно экспрессирующегося в клетках CHO, либо биотинилированного и небитинилированного smCD154 (SEQ ID NO: 5). После нескольких циклов пэннинга выполняли твердофазный ИФА с поликлональными фагами с использованием smCD154 в качестве антигенов для обнаружения специфического обогащения в отдельных экспериментах по пэннингу. Фаги, собранные в результате таких экспериментов по пэннингу, которые показали обогащение на связующие smCD154 вещества, подвергали дополнительному скринингу твердофазным ИФА с моноклональными Fab, при котором белки Fab, экспрессированные из отдельных клонов Fab, применяли как связующие небитинилированный smCD154 вещества, нанесенные непосредственно на планшет. Клоны Fab, для которых сигнал связывания в четыре раза превышал сигнал от Fab отрицательного контроля, отбирали для скрининга в формате полных IgG. Выбранные Fab клонировали в каркас IgG2sigma/каппа и дополнительно определяли характеристики связывания с клетками D1.1 Jurkat. IgG2sigma представляет собой заглушенный Fc и имеет замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа. Описание IgG2sigma представлено в патенте США № 8,961,967.

Пример 3. Получение антител к CD154 на крысах.

Антитела к CD154 получали, используя трансгенных крыс, экспрессирующих локусы человеческих иммуноглобулинов, OmniRat®; OMT, Inc. Эндогенные локусы иммуноглобулинов в OmniRat® заменены человеческими локусами Igκ и Igλ, а химерный локус IgH человека/крысы с сегментами V, D и J человеческого происхождения связан с крысиным локусом C<sub>H</sub>. Локус IgH содержит 22 человеческих V<sub>H</sub>, все человеческие сегменты D и J<sub>H</sub> в природной конфигурации связаны с крысиным локусом C<sub>H</sub>. Получение и определение характеристик крыс OmniRat® описано в Osborn, et al. J Immunol 190: 1481-1490, 2013; и международной патентной публикации № WO2014/093908.

Крыс OmniRat® иммунизировали smCD154 с использованием протокола повторяющейся иммунизации во множестве участков (RIMMS). После 45-дневной схемы иммунизации у всех четырех крыс забирали лимфоузлы и использовали их для получения гибридом. Супернатанты гибридом в 96-луночных планшетах подвергали скринингу путем связывания в твердофазном ИФА для выявления mAb, проявляющих связывание с smCD154, из числа которых отбирали супернатанты гибридом, показывающие при анализе сигнал, более чем в 3 раза превышающий средний сигнал отрицательного контроля.

Выбранные антитела клонировали в виде полноразмерных IgG2sigma/λ. Антитела, демонстрирующие антагонистическую активность в отношении индуцированной CD154 активации клеток Ramos, отбирали для дальнейшего определения характеристик.

Пример 4. Определение характеристик антител.

Несколько антител к CD154, полученных из фагового дисплея или трансгенных животных, экспрессирующих локусы человеческих иммуноглобулинов, продемонстрировавших антагонистическую активность, как описано в примерах 2 и 3, секвенировали и дополнительно определяли их характеристики по связыванию с дендритными клетками человека и яванского макака, по способности ингибировать функции дендритных клеток и В-клеток человека и яванского макака, и по эффекторным функциям антител. Области VH и VL антител секвенировали с использованием стандартных способов.

В табл. 2 показаны аминокислотные последовательности HCDR1 выбранных антител.

В табл. 3 показаны аминокислотные последовательности HCDR2 выбранных антител.

В табл. 4 показаны аминокислотные последовательности HCDR3 выбранных антител.

В табл. 5 показаны аминокислотные последовательности LCDR1 выбранных антител.

В табл. 6 показаны аминокислотные последовательности LCDR2 выбранных антител.

В табл. 7 показаны аминокислотные последовательности LCDR3 выбранных антител.

В табл. 8 показаны аминокислотные последовательности VH выбранных антител.

В табл. 9 показаны аминокислотные последовательности VL выбранных антител.

Таблица 2

Идентификатор mAb	HCDR1	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	SYAIS	16
C4LB89	SYGIS	17
C4LB94	SYAIS	16
C4LB150	SYSFYWG	18
C4LB189	AYYIH	19
C4LB191	DYYIH	20
C4LB199	SFIYYWG	21

Таблица 3

Идентификатор mAb	HCDR2	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	GIPIFGTANYAQKFQG	22
C4LB89	WISPIFGNTNYAQKFQG	23
C4LB94	GISPYFGNTNYAQKFQG	24
C4LB150	SLYYSGSTYYNPSLKS	25
C4LB189	RINPDSGGTDYAQRFQG	26
C4LB191	RFNPNSGDTNGAQKFQG	27
C4LB199	CIYSSGGTYYNPSLKS	28

Таблица 4

Идентификатор mAb	HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	GASVWDGPAEVFDY	29
C4LB89	SRYYGDLDY	30
C4LB94	DTGWVGAFYLDY	31
C4LB150	LQLGTTTDYFDH	32
C4LB189	DWNYDGGSGYFGPGYYGLDV	33
C4LB191	EGELAGIFFDY	34
C4LB199	LWLGTTTDYFDY	35

Таблица 5

Идентификатор mAb	LCDR1	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	KSSQSVLASSNNENFLA	36
C4LB89	RASQSISSYLN	37
C4LB94	KSSQSVLYSSNNKNYLA	38
C4LB150	SGDELGDKFAC	39
C4LB189	SGDKLGDKYVC	40
C4LB191	SGDKLGDKYVS	41
C4LB199	SGDKLGDKFAC	42

Таблица 6

Идентификатор mAb	LCDR2	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	SASTRES	43
C4LB89	YANSLQS	44
C4LB94	WASTRES	45
C4LB150	QENKRPS	46
C4LB189	QDRKRPS	47
C4LB191	QDRKRPS	47
C4LB199	QDDKRPS	48



Таблица 7

Идентификатор mAb	LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	QQAYTTPFT	51
C4LB89	QQSDSIPWT	52
C4LB94	QQYYSTPLT	53
C4LB150	QAWSDTAV	54
C4LB189	QAWDSGTVV	55
C4LB191	QAWDSSTVV	56
C4LB199	QAWDSNTVV	57

Таблица 8

Идентификатор mAb	Название VH	VH	
		Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LH12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLE WMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGASVWDGPAEAVFDYWGQGTLLVTVSS	58
C4LB89	C4LH165	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLE WMGWIPIFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARSRYGDLDYWGQGTLLVTVSS	59
C4LB94	C4LH99	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLE WMGGISPYFGNTNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDTGWVGAFLDYWGQGTLLVTVSS	60
C4LB150	C4LH201	QLQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGGSISSSYFYWGIRPPGQG LEWIGSLYSGSTYYNPSLKRATMSVVTSKTQFSLNLSVTAADT AVYYCARLQLGTTTDFYDHWGQGTLLVTVSS	61
C4LB189	C4LH240	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFAAYYIHWVRQAPGQGLE WMGRINPDSGGTDYARFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTA VFYCARDWNYDGSYFGPGYGLDVWGQGTVTVTVSS	62
C4LB191	C4LH242	QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSKASGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLE WVGRFPNSGDTNGAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELTRLRSDDTA VYHCAREGELAGIFFDYWGQGTLLVTVSS	63
C4LB199	C4LH250	QVQLQESGPGLVKPESETLSLTCTVSGDSISSFIYWGIRPPGKG LDWVGCIIYSGGTYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKLPVTAADT AVYYCARLWLGTTTDFYDHWGQGTLLVTVSS	64

Таблица 9

Идентификатор mAb	VL	VL	
		Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LL8	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLASSNENFLAWYQQKP GQPPKLLIYASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQQAYTTPFTFGQGTKVEIK	65
C4LB89	C4LL49	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKL LIYYANSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSD SIPWTFGQGTKVEIK	66
C4LB94	PH9L2	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSNNKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	67
C4LB150	C4LL82	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDKFACWYQQKPGQSPVLV IWQENKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDS DTAVFGGGTKLTVL	68
C4LB189	C4LL116	SYELTQPPSVSVSPGQTASVTCSGDKLGDYVWCYQRKPGQSPVLV IYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAIADYYCQAWDS GTVVFGRGKTLTVL	69
C4LB191	IAPL39	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYVSWNHQKPGQSPVLV IYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDS STVVFGGGKTLTVL	70
C4LB199	C4LL125	SYELTQPPSVSVSPGQTVSITCSGDKLGDYVWCYQRKPGQSPVVV IYQDKRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDS NTVVFGGGKTLTVL	71

Антитела ингибировали как функцию эндогенного CD154 на клетках Jurkat (клетки D1.1 Jurkat в табл. 10), так и рекомбинантно экспрессированного тримера человеческого CD154 (экспрессированного в виде shCD154-ILZ или shCD154-his) по данным измерения в анализе гена-репортера NF-κB SEAP. Антитела ингибировали сигнализацию со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 0,08-21,15 нМ. Значения IC<sub>50</sub> для выбранных антител в данном анализе показаны в табл. 10. Значения IC<sub>50</sub> в таблице для каждого антитела представляют собой наибольшие и наименьшие значения IC<sub>50</sub>, полученные в отдельных экспериментах, а единственное значение указывает, что антитело тестировалось в одном эксперименте, или имеется только одно достоверное значение IC<sub>50</sub>.

Таблица 10

Идентификатор mAb	Анализ гена-репортера NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)		
	D1.1. Jurkat*	shCD154-ILZ*	shCD154-his*
C4LB5	1,55	0,54	1,03-1,37
C4LB89	0,08-0,32	1,91-2,44	3,93-5,69
C4LB94	0,13	4,37	7,57-21,15
C4LB150	3,57	4,95	8,87-9,81
C4LB189	2,06	1,63	6,51-13,60
C4LB191			2,19-3,46
C4LB199	1,21	1,09	2,00-2,70

\*Формат CD154, использованный для индукции сигнализации

Способность антител ингибировать активацию дендритных клеток оценивали с использованием секреции IL-12p40 в качестве маркера активации DC. Антитела ингибировали активацию DC, вызванную эндогенным CD154 на клетках Jurkat, со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,02 до 0,49 нМ. В табл. 11 показаны значения IC<sub>50</sub>, полученные при анализе выбранных антител. Диапазон IC<sub>50</sub> в таблице представляет собой наименьшее и наибольшее значение IC<sub>50</sub>, полученные в отдельных экспериментах по 2-4 донорам в 1-6 повторах.

Таблица 11

Идентификатор mAb	Анализ опосредованной клетками Jurkat активации дендритных клеток; IC <sub>50</sub> (нМ)
C4LB5	0,32-0,49
C4LB89	0,02-0,09
C4LB94	0,07-0,09
C4LB150	0,25-0,30
C4LB189	0,15-0,16
C4LB191	0,38-0,39
C4LB199	0,19-0,20

Способность антител ингибировать активацию В-клеток человека или яванского макака измеряли с использованием в качестве показателя пролиферации В-клеток. Антитела ингибировали пролиферацию, вызванную как эндогенным CD154 (клетки D1.1 Jurkat), так и рекомбинантным тримером человеческого CD154 (shCD154-ILZ) со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне 0,01-5,35 нМ. В табл. 12 показаны значения IC<sub>50</sub> для разных антител, полученные при анализе активации В-клеток человека или яванского макака. Диапазон IC<sub>50</sub> в таблице представляет собой наименьшее и наибольшее значение IC<sub>50</sub>, полученные в отдельных экспериментах по 2-4 донорам в 1-6 повторах. Единственное значение IC<sub>50</sub> в таблице указывает на наличие одного достоверного значения IC<sub>50</sub>.

Таблица 12

Идентификатор mAb	Анализ активации В-клеток; IC <sub>50</sub> (нМ)		
	Клетки D1.1 Jurkat/человеческие В-клетки*	shCD154-ILZ/человеческие В-клетки*	shCD154-ILZ/В-клетки яванского макака*
C4LB5	0,19-0,28	2,74	5,35
C4LB89	0,01-0,02	0,20-0,48	0,13-0,44
C4LB94	0,01-0,03	0,07-0,14	0,30-0,31
C4LB150	0,27-0,31	НВ	1,14-2,00
C4LB189	0,47-0,65	НВ	4,35-5,16
C4LB191	0,64-1,00	НВ	0,25-0,36
C4LB199	0,04-0,27	НВ	1,89-2,31

НВ: не выполняли  
\*Формат CD154, использованный для индукции сигнализации/источника В-клеток

Пример 5. Конструирование антител для сведения к минимуму риска посттрансляционной модификации.

VL антитела C4LB89 содержала предполагаемый участок дезаминирования в LCDR2 (N52-S53 в легкой цепи C4LL49, SEQ ID NO: 66). Были сделаны отдельные замены в каждом положении (N52S и

S53T) в VL. Мутированные легкие цепи совместно экспрессировали с родительской тяжелой цепью C4LH165 (SEQ ID NO: 59) с образованием антител C4LB235 и C4LB236 в форме IgG2sigma/κ. Аминокислотные последовательности LCDR2 и VL из C4LB235 и C4LB236 показаны в табл. 13 и табл. 14, соответственно. C4LB235 содержит HCDR с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, LCDR с SEQ ID NO: 37, 49 или 52, VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 72. C4LB236 содержит HCDR с SEQ ID NO: 17, 23 и 30, LCDR с SEQ ID NO: 37, 50 или 52, VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 73.

Таблица 13

Идентификатор mAb	LCDR2	
	Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB235	YASSLQS	49
C4LB236	YANTLQS	50

Таблица 14

Идентификатор mAb	VL	VL	
		Последовательность	SEQ ID NO:
C4LB235	C4LL160	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFRSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGGQTKVEIK	72
C4LB236	C4LL161	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYANTLQSGVPSRFRSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGGQTKVEIK	73

Оба антитела тестировали на способность ингибировать пролиферацию В-клеток яванского макака. C4LB235 проявило эффективность, сходную с C4LB89, а C4LB236 проявило сниженную активность по сравнению с C4LB89.

Пример 6. Антитела к CD154 с заглушенной эффекторной функцией не индуцируют активацию тромбоцитов.

В клинике исследованы антитела к CD154, дающие положительные результаты у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, однако из-за случаев тромбоэмболии (ТЕ) дальнейшая клиническая разработка этих антител остановлена. Гуманизированное антитело 5с8 (IgG1/κ) представляет собой антитело к CD154, которое в клинике приводило к ТЕ (Yazdany et al., *Lupus* 13:377-380, 2004). Была выдвинута гипотеза, что тромбоэмболия (ТЕ), опосредованная гуманизированным 5с8, является результатом активации и агрегации тромбоцитов из-за формирования иммунных комплексов (IC) антитело к CD154/CD154 высшего порядка, которые перекрестно связывают тромбоциты путем связывания Fc с рецептором FcγRIIa тромбоцитов. В условиях *in vitro* сконструированное антитело 5с8 с заглушенным Fc (замена D265A в IgG1), не связывающее рецептор FcγRIIa, не активирует тромбоциты (Xie et al., *J Immunol* 192:4083-4092, 2014).

Антитела к CD154, имеющие нарушенное связывание по меньшей мере с FcγRIIa и имеющие сниженные эффекторные функции, таким образом, могут быть более приемлемым терапевтическим средством со сниженным риском развития ТЕ.

С этой целью были получены антитела к CD154 с заглушенной эффекторной функцией, имеющие различные замены в Fc, и протестированы в плане влияния на активацию тромбоцитов.

VH и VL гуманизированного антитела 5с8 (Karpusas et al., *Structure* 9: 321-329, 2001) клонировали в форме IgG1sigma/κ, IgG1sigmaYTE/κ, IgG2sigma/κ или IgG2sigmaYTE/κ с целью оценки влияния Fc на активацию тромбоцитов; полученные антитела были названы 5с8IgG1sigma, 5с8IgG1sigmaYTE, 5с8IgG2sigma и 5с8IgG2sigmaYTE). IgG1sigma содержит замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа. IgG1sigmaYTE содержит замены L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E H268A, A330S и P331S. IgG2sigma содержит замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S. IgG2sigmaYTE содержит замены V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S и P331S. Нумерация остатков соответствует индексу EU. У антител с каркасом IgG2sigma отсутствуют эффекторные функции и связывание с FcγR, что описано в патенте США № 8,961,967. Замена YTE (M252Y, S254T, T256E) описана в Dall'Acqua et al., *J Biol Chem* 281:23514-24, 2006.

Домены VH и VL гуманизированного 5с8 описаны в SEQ ID NO: 74 и 75, соответственно.

SEQ ID NO: 74

QQQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYVWKQAPGQGLEWIGIEINPSNGDTN

FNEKFKSKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRS DGRNDMDSWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 75

DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQRVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLE

SGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFATYYCQHSWEIPPTFGGGTKLEIK

5c8IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma и 5c8IgG2sigmaYTE исследовали на предмет влияния на активацию тромбоцитов.

Использовали кровь здоровых людей-доноров, прошедших предварительный скрининг по низкому ответу только на shCD154. Активацию тромбоцитов исследовали методом проточной цитометрии с использованием валидированных маркеров активации тромбоцитов PAC-1 (активированный GPIIb/IIIa) и CD62p (P-селектин). Вкратце, цельную кровь (WB) добавляли в модифицированный буферный раствор Tyrodes-HEPES, содержащий 1 mM CaCl<sub>2</sub>, и к смеси добавляли антитела к PAC1 и к CD62p с блокирующим FcγRIIa антителом или без такового (клон IV.3, StemCell Technologies, № 60012), после чего инкубировали ее в течение 25 минут. К смеси добавляли предварительно сформированные иммунные комплексы растворимого CD154 (PeproTech, кат. № 310-02; SEQ ID NO: 4 или Tonbo Biosciences, кат. № 21-7088) /антитела с молярным соотношением CD154 и антитела к CD154 3: 1 и инкубировали еще 20 минут; тромбоциты фиксировали в 1% формалине, после чего проводили анализ FACS. Активацию тромбоцитов для каждого условия оценивали как % долю отобранных тромбоцитов (CD61-положительных событий), экспрессирующих PAC-1 и CD62p; для каждого условия обработки фиксировали и анализировали 5000 событий экспрессии CD61 (тромбоцитов). Результаты эксперимента показаны на фиг. 1. IC CD154/5c8IgG1 (IgG1 дикого типа) активировали тромбоциты, тогда как IC CD154 с 5c8-IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma и 5c8IgG2sigma-YTE не активировали тромбоциты. Активация тромбоцитов при помощи ADP не ингибировалась иммунными комплексами (данные не показаны). Ни одно из антител само по себе не активировало тромбоциты (данные не показаны).

Антитела к CD154 C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199 (все mAb IgG2sigma с заглушенной эффекторной функцией) также были протестированы в анализе активации тромбоцитов, чтобы подтвердить, что антитела утратили связывание с FcγRIIa и не активируют тромбоциты. На фиг. 2 показаны результаты эксперимента, демонстрирующие, что иммунные комплексы CD154 в комплексе с C4LB5, C4LB89, C4LB150, C4LB189, C4LB191 или C4LB199 не активировали тромбоциты. IC CD154/ C4LB94 индуцировали PAC-1 на тромбоцитах. Результаты демонстрируют, что антитела к CD154 с изотипами IgG1sigma, IgG1sigmaYTE, IgG2sigma или IgG2sigmaYTE в целом не могут активировать тромбоциты и, следовательно, могут иметь улучшенный профиль безопасности относительно антител на основе IgG1 дикого типа.

Пример 7. Влияние переключения изотипа на свойства антител.

Вариабельные области антитела C4LB89 клонировали в форме изотипов IgG1sigma/κ и IgG1sigmaYTE для оценки возможных отличий по функциональности и возможностей для разработки. Новые антитела были названы C4LB231 (IgG1sigma) и C4LB232 (IgG1sigmaYTE).

Полученные антитела IgG1sigma и IgG1sigmaYTE сравнивали с родительским антителом по функциональности. Антитела C4LB231 и C4LB232 были сопоставимы по функциям с родительским C4LB89. В табл. 15 показаны значения IC<sub>50</sub> или диапазон значений IC<sub>50</sub> для каждого антитела в функциональных анализах, показанных в таблице. Диапазон IC<sub>50</sub> в таблице представляет собой наименьшее и наибольшее значение IC<sub>50</sub>, полученное в экспериментах по 2-4 донорам в 1-6 повторах. Единственное значение IC<sub>50</sub> в таблице указывает на наличие одного достоверного значения IC<sub>50</sub>.

Таблица 15

Анализ	Формат CD154, использованный для индукции сигнализации	mAb	
		C4LB231	C4LB232
Анализ гена-репортера NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	D1.1 Jurkat		0,27
Анализ гена-репортера NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-ILZ	1,21	1,25-1,45
Анализ гена-репортера NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-his	2,15	1,77-1,99
Анализ опосредованной клетками Jurkat активации дендритных клеток; IL-12p40 IC <sub>50</sub> (нМ)	D1.1 Jurkat	0,02-0,04	0,03-0,03
пролиферация человеческих В- клеток, IC <sub>50</sub> (нМ)	D1.1 Jurkat	0,01-0,01	0,01-0,01
пролиферация человеческих В- клеток, IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-ILZ	0,38-0,67	0,42-0,74
пролиферация В-клеток яванского макака, IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-ILZ	0,25-0,55	0,20-0,55

C4LB231 и C4LB232 также были протестированы в плане их влияния на тромбоциты. Ни IC shCD154:C4LB231, ни IC shCD154:C4LB232 не активировали тромбоциты в сравнении с исходным уровнем. IC CD154/5c8IgG1 активировал тромбоциты и активация блокировалась в присутствии IV.3, и

это показывает, что активация тромбоцитов опосредована связыванием IC с Fc $\gamma$ RIIa. На фиг. 3 показаны результаты эксперимента.

Пример 8. Антитела к CD154 связывают человеческий CD154 с высокой аффинностью.

Измерения аффинности проводили с использованием ProteOn, как описано в примере 1. Значения скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинности показаны в табл. 16. Параметры, приведенные в данной таблице, получены на модели связывания Ленгмюра 1: 1 для всех образцов, за исключением C4LB94 и C4LB150, которые аппроксимировали моделью связывания с двумя состояниями.

Таблица 16

Образец	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K <sub>D</sub> (М)
C4LB5	5,70E+05	1,78E - 04	3,12E - 10
C4LB89	1,61E+06	3,80E - 04	2,35E - 10
C4LB94	1,58E+06	3,29E - 03	2,09E - 09
C4LB150	2,27E+06	6,17E - 03	2,72E - 09
C4LB189	3,55E+05	2,06E - 04	5,81E - 10
C4LB191	5,62E+06	1,76E - 04	3,13E - 11
C4LB199	1,60E+06	4,04E - 04	2,53E - 10

Пример 9. Кристаллическая структура CD154 игрушки в комплексе с C4LB89.

Эпитоп антитела C4LB89 определяли с помощью рентгенокристаллографии. Имеющий His-метку Fab-фрагмент C4LB89 и имеющую His-метку растворимую форму CD40L игрушки (smCD154-his) экспрессировали в клетках HEK293 GnTI и очищали с использованием аффинной хроматографии и гель-фильтрационной хроматографии. Комплекс smCD154:C4LB89 инкубировали в течение ночи при 4°C, концентрировали и отделяли с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Комплекс кристаллизовали из раствора, содержащего 16% PEG 3350, 0,2 М цитрата аммония, 0,1 М MES, pH 6,5, методом диффузии паров. Кристаллы принадлежали к кубической пространственной группе P2<sub>1</sub>3 с размером элементарной ячейки 162,1 Å. Структуру комплекса определяли методом молекулярного замещения с использованием в качестве поисковых моделей кристаллических структур C4LB89 Fab и CD40L (идентификатор входа в PDB - 1ALY).

Комплекс smCD154:C4LB89 представляет собой симметричный тример, расположенный на кристаллографической оси симметрии 3-го порядка. C4LB89 связывает mCD154 на границе между двумя субъединицами в эпитопе, дистальном от клеточной поверхности. Эпитоп содержит 16 остатков, по 8 от каждой из двух субъединиц CD154. Эпитопными остатками являются E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 и R207 в первой субъединице CD154 и T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F253 во второй субъединице CD154. Нумерация остатков эпитопа соответствует полноразмерному человеческому CD154 с SEQ ID NO: 1. Паратоп определяется как остатки антитела, находящиеся в пределах 4 Å от остатков CD154. Паратоп C4LB89 включает в себя 9 остатков из тяжелой цепи C4LB89: S31 и Y32 из HCDR1, S52, I54, F55 и N57 из HCDR2 и R100, Y101 и Y102 из HCDR3. Нумерация остатков паратопа соответствует VH C4LB89 с SEQ ID NO: 59. Легкая цепь не участвует в контактах с mCD154. Учитывая количество контактов, F55 в HCDR2 является ключевым элементом для распознавания антигена. F55 образует контакт с остатками CD154 T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F253. Остатки HCDR3 Y101 и Y102 также участвуют в связывании. На фиг. 4 показаны контактные остатки HCDR2 и HCDR3 и отсутствие связывания LC с CD154. На фиг. 5 показаны в виде рисунка остатки эпитопа и паратопа.

Растворимые белки CD154 человека и игрушки отличаются всего на 8 аминокислотных остатков. Все эпитопные остатки mCD154 C4LB89 у человека являются консервативными. Следовательно, ожидается, что эпитоп будет консервативным при сравнении CD154 человека и игрушки. Выравнивание полноразмерных белков CD154 человека и игрушки показано на фиг. 6.

Пример 10. Активация тромбоцитов антителами к CD154 зависит от эпитопа.

Варибельные области C4LB89 (VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 66) клонировали в форме IgG1/κ, получив антитело C4LB237. Было подтверждено, что C4LB237 сохраняет связывание человеческого CD154 (табл. 17) по данным измерений с использованием ProteOn, как описано в примере 1. Аффинность C4LB237 к человеческому CD154 составляла 23,6 ± 5,4 пМ. Оказалось, что переключение изотипа VH/VL, полученных от C4LB89, с IgG2sigma на IgG1 изменяло аффинность связывания полученных антител.

Как и ожидалось, C4LB237 связывало человеческий Fc $\gamma$ RIIa и Fc $\gamma$ RIIIa с K<sub>D</sub> 0,994 мкМ и 0,146 мкМ, соответственно. C4LB237 показало активность, сходную с C4LB231, и более высокую, чем C4LB89 в анализах гена-репортера NF-κB SEAP, если для индукции сигнализации использовали shCD154-his (табл. 18).

C4LB237 тестировали на предмет влияния на активацию тромбоцитов. IC shCD154:C4LB237 не активировали тромбоциты выше исходного уровня, что показано на фиг. 7. Этот результат свидетельствует, что помимо Fc, на способность антитела или ее отсутствие в отношении активации тромбоцитов влияет эпитоп антитела.

Таблица 17

Образец	$k_a$ (1/Мс) $10^6$	$k_d$ (1/с) $10^{-05}$	$K_D$ (нМ)
C4LB231 (n=8)	2,53 ± 0,15	7,81 ± 0,69	31,0 ± 3,3
C4LB232 (n=8)	2,54 ± 0,15	8,89 ± 0,91	35,2 ± 5,2
C4LB237 (n=4)	2,59 ± 0,20	6,05 ± 0,98	23,6 ± 5,4

Таблица 18

mAb	$IC_{50}$ (нМ)	95% CI $IC_{50}$ (нМ)
C4LB231	2,32	2,11-2,55
C4LB237	2,56	2,43-2,70
C4LB89	6,22	5,27-7,34

Пример 11. Введение нейтральных мутаций в C4LB89.

Анализы кристаллической структуры C4LB89 в комплексе с CD154 выявили положения в CDR C4LB89, которые можно подвергать мутации без влияния на общую структуру комплекса и от которых, следовательно, можно ожидать отсутствия влияния на свойства антитела C4LB89. Эти нейтральные мутации в CDR легкой цепи перечислены в табл. 19, а нейтральные мутации в CDR тяжелой цепи - в табл. 20. Нумерация остатков, которые можно подвергать мутации, показана как на отдельных CDR, так и на VL или VH. Например, остаток Q4 в LCDR1 с SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN) можно мутировать в A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W или Y, и ожидать, что характеристики антитела по существу не изменятся. Соответствующий остаток в VL с SEQ ID NO: 66 представляет собой Q27.

Мутации, показанные в табл. 19 или табл. 20, выполнены в C4LB89 по одиночке или в комбинации с использованием стандартных способов. Экспрессировали полученные пары VH/VL, а мутировавшие антитела выделяли и определяли их характеристики с использованием способов, описанных в настоящем документе.

Таблица 19

LCDR C4LB89	Остаток LCDR C4LB89	VL C4LB89 (SEQ ID NO: 66)	Возможные замены
LCDR1 SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN)	Q4	Q27	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W, Y
	S5	S28	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S7	S30	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S8	S31	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
CDR2 с SEQ ID NO: 44 (YANSLQS)	A2	A51	S
	N3	N52	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
	S4	S53	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	L5	L54	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
	Q6	Q55	E, D, N
LCDR3 с SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT)	S7	S56	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	S3	S91	A
	D4	D92	N
	S5	S93	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W, Y
	I6	I94	A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R,
			S, T, V

Таблица 20

HCDCR C4LB89	Остаток HCDCR C4LB89	VH C4LB89 (SEQ ID NO: 59) Положение остатка	Возможные замены
HCDCR1 SEQ ID NO: 17 (SYGIS)	S1	S31	A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T, V
	I4	I34	M, L, V
	S5	S35	A
HCDCR2 с SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKF QG)	S3	S52	A, T, V
	I5	I54	V, T, L Q, E
	N8	N57	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
	T9	T58	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, Y
	N10	N59	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
HCDCR3 с SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY),	S1	S99	A, M
	R2	R100	A, S, Q, K
	R7	L105	M

Пример 12. Оценка активации тромбоцитов и формирование иммунного комплекса высшего порядка.

При оценке данных по кристаллической структуре комплекса области Fab и shCD154 для более ранних экспериментов с C4LB231 и 5C8IgG1 при помощи гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ) и динамического светорассеяния (DLS), а также изучения данных об активации тромбоцитов, была выдвинута гипотеза, что небольшие отличия в связывании антител к CD154 с тримером shCD154 могут облегчить формирование иммунного комплекса высшего порядка: 1) Fab C4LB231 связывается между 2 субъединицами тримера sCD154, а Fab 5C8 связывает 1 субъединицу SCD154, 2) Fab C4LB231 оказывается более жестким в такой конформации, чем Fab 5c8 3) и угол связывания антитела к CD154 с SCD154.

Чтобы дополнительно оценить роль эпитопа антитела, опосредующего активацию тромбоцитов и образование иммунного комплекса высшего порядка с shCD154, VH и VL различных антител к CD154 клонировали и экспрессировали в виде изоформ IgG2sigma и IgG1sigma с заглушенным Fc, или в виде IgG1. Созданные антитела представлены в табл. 21. Анализы активации тромбоцитов проводили, как описано в примере 6. Для проведения оценок при формировании иммунного комплекса высшего порядка методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ) и динамического светорассеяния (DLS) получали комплексы антител с shCD154 в молярных соотношениях 1: 1 (также именуемом 10: 10) и 10: 1 с целью выявления наличия зависимых от концентрации различий при образовании иммунных комплексов.

Таблица 21

Название антитела	Изотип	VH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:
5C8IgG2sigma (C4LB71)	IgG2σ	74	75
5C8IgG1 (MSCB8)	IgG1		
C4LB89	IgG2σ	59	66
C4LB231	IgG1σ		
C4LB237	IgG1		
C4LB119	IgG2σ	84	85
C4LB290	IgG1σ		
C4LB287	IgG1		
C4LB83	IgG2σ	86	87
C4LB288	IgG1		
C4LB94	IgG2σ	60	67
C4LB234	IgG1σ		
C4LB289	IgG1		
IgG2σ: IgG2sigma IgG1σ: IgG1sigma			

SEQ ID NO: 84 VH C4LB119

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYYISWVRQAPGQGLEWMGAIDPYFGYAN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTGLNYGGFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 85 VL C4LB119

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP  
 ARFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 86 VH C4LB83

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYIAISWVRQAPGQGLEWMGWIIPFGNTN  
 YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDFRGYTKLDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 87 VL C4LB83

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIINWLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTITISLQPEDFATYYCQSFSPFYTFGQGTKVEIK

Для C4LB83 и C4LB119 характеристики связывания и функциональность оценивали с использованием протоколов, описанных в примере 1, а данные показаны в табл. 22.

Таблица 22

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K <sub>d</sub> (М)	Анализ активации В-клеток, IC <sub>50</sub> (нМ) *
C4LB83	2,10E+06	4,70E - 03	2,23E - 09	0,64-1,09
C4LB119	1,84E+06	8,80E - 03	4,79E - 09	0,81-2,03

\*shCD154-IL2 индуцировал активацию человеческих В-клеток. Диапазон показывает наименьшее и наибольшее значения IC<sub>50</sub>, полученные в отдельных экспериментах на 2 донорах

#### Способы ГФ-ВЭЖХ.

Иммунные комплексы антител, указанных в табл. 21, и меченного Alexafluo-448 shCD154 готовили в молярном соотношении антитела и shCD154 1: 1 и 10: 1 в 110 мкл 1x PBS и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Для каждого прогона в колонку (Agilent, система 1100/1200) вводили по 100 мкл каждого образца, содержащего 5 мкг меченного AF488 shCD154 и 15 мкг (соотношение 1: 1) или 150 мкг (соотношение 10: 1) mAb к CD154. Молекулярную массу определяли на основе времени удерживания стандартов (Bio-Rad). Взаимоотношение между молекулярной массой и временем удерживания белка удовлетворяет следующему уравнению:

$$\log (M)=b - c T,$$

где M - молекулярная масса, T - время удерживания, a b и c - константы. Линейную кривую зависимости log(M) от T получали по ГФ-ВЭЖХ хроматограмме стандартов с аппроксимацией методом наименьших квадратов с R<sup>2</sup>=0,9928.

#### DLS.

Измерение методом DLS основано на принципах светорассеяния и молекулярного или броуновского движения. Броуновское движение, характерное движение молекул в растворе, вызывает рассеивание света как по фазе, так и вне фазы, что приводит к усиливающей и ослабляющей интерференции. Результатом является то, что интенсивность рассеянного света колеблется со временем. При анализе DLS или QELS (квазиэлектрическое светорассеяние) эта зависящая от времени флуктуация интенсивности рассеянного света захватывается быстрым счетчиком фотонов. Флуктуации прямо пропорциональны скорости диффузии. Решение для корреляционных данных с использованием уравнения Стокса - Эйнштейна дает гидродинамический радиус. В отличие от методов гель-фильтрационной хроматографии-многоуглового светорассеяния (SEC-MALS) или SEC, где степень различия образца позволяет различать мономер и димер, DLS позволяет различать только вещества, отличающиеся размерным коэффициентом ~ 4, и, следовательно, различение начнется с мономера и тетрамера; хотя мономер и димер неразличимы, будет определено средневзвешенное значение для смеси.

Уравнение Стокса - Эйнштейна:  $R_h = kT / 6\pi\eta D$ ;

где D=коэффициент диффузии,

k=константа Больцмана,

T=температура,

$\eta$ =вязкость.

Отдельные антитела в концентрации 10 мкМ или иммунные комплексы антител, показанных в табл. 21, и shCD154 готовили в молярных концентрациях антитела и shCD154 10: 1 или 10: 10 (10 мкМ антитела либо на 1 мкМ, либо на 10 мкМ shCD154) в PBS. Все образцы готовили в стеклянных флаконах со вставками во флакон (250 мкл дезактивированное стекло с полимерной лапкой, Agilent кат. № 5181-8872) и образцы добавляли в следующем порядке: PBS, mAb, shCD154. Образцы перемешивали путем осторожного встряхивания при КТ, с качанием (Nutating Mixer (VWR) ~ 30 об/мин в течение приблизительно 23 ч. При необходимости антитела сначала концентрировали стандартными способами.



Размер частиц и распределение вещества во всех образцах определяли на планшетном сканере DynaPro Plate Reader DLS (Wyatt Technologies Corporation) при 23°C. Достоверность DLS сначала валидировали при помощи BSA (данные не показаны). Измерения выполняли, вводя 30 мкл образца в каждую из 3 лунок (измерения в трех повторках). Измерения DLS проводили на планшетном сканере DynaPro. Выполняли двадцать 5-секундных считываний для каждого образца и прибор выполнял автоматическую корректировку мощности лазера. К параметрам, использованным при анализе данных, относились вязкость при 23°C для PBS, составившая 1,019 сП, и значение показателя преломления при 589 нм и 23°C для PBS, составившее 1,333. Программа использовала модель глобулярного белка. Сигналы объединялись в пики, где пик 1 составлял 0,1-10 нм, пик 2 составлял 10-100 нм, пик 3 составлял 100-1000 нм и пик 4 составлял 1000-5000 нм. Регистрировали видимые осадки в образце (если они образовывались). Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Dynamics (Wyatt Technology Inc.). Строили графики зависимости процентного значения массы относительно радиуса частиц (Rh). Вычисляли и регистрировали пиковый радиус, полидисперсность, процентное значение массы и процентную интенсивность.

Результаты. Активация тромбоцитов.

Оценивали способность иммунных комплексов shCD154 и антител, экспрессированных в форме IgG2sigma или IgG1sigma с заглушенным Fc, или в форме IgG1 дикого типа, активировать тромбоциты. В качестве контроля использовали антитело 5c8, клонированное на разных каркасах IgG. На фиг. 3 показано, что иммунные комплексы 5c8IgG1:shCD154 активировали тромбоциты зависимым от FcγRIIIa образом, поскольку антитело к FcγRIIIa ингибировало опосредованную 5c8IgG1 активацию тромбоцитов. Области VH/VL 5c8, клонированные на в форме с заглушенным эффекторным Fc IgG1sigma или IgG2sigma, теряли способность активировать тромбоциты (фиг. 1). Такие результаты соответствуют описанным ранее. Однако неожиданно эксперименты, проведенные в примере 10, показали, что иммунные комплексы с антителом IgG1 дикого типа (C4LB237:shCD154) не активировали тромбоциты (фиг. 7), что указывает на необходимость дальнейших исследований возможной зависимости активации тромбоцитов от эпитопа.

Области VH/VL 4 отдельных антител клонировали в форме IgG2sigma, IgG1sigma или IgG1 дикого типа, чтобы оценить влияние эпитопа и/или Fc на активацию тромбоцитов, а также на формирование иммунных комплексов высшего порядка. В противоположность данным, описанным ранее в литературе, было обнаружено, что активация тромбоцитов в некоторых случаях опосредовалась эпитопом антитела независимо от опосредованного FcγRIIIa перекрестного связывания.

На фиг. 8A, фиг. 8B и фиг. 8C представлены сводные данные анализов. Иммунные комплексы антител C4LB119 (фиг. 8A) и C4LB94 (фиг. 8B) с заглушенными Fc, активировали тромбоциты независимым от FcγRIIIa способом, поскольку предварительное блокирование антителом к FcγRIIIa не обеспечивало ингибирования активации тромбоцитов. IC C4LB83, также антителом с заглушенным Fc, умеренно активировал тромбоциты (фиг. 8C). IC антител с идентичными доменами VH/VL, клонированными на IgG1 дикого типа, в каждом случае активировал тромбоциты опосредованным FcγRIIIa образом (C4LB278 на фиг. 8A, C4LB289 на фиг. 8B и C4LB288 на фиг. 8C). Таким образом, было выявлено несколько антител, опосредующих активацию тромбоцитов, несмотря на наличие заглушенного Fc. Было выявлено, что одна пара доменов VH/VL не опосредовала активацию тромбоцитов ни на заглушенном (C4LB231), ни на относящемся к IgG1 дикого типа (C4LB237). Эти данные демонстрируют, что эпитоп антитела играет определенную роль в опосредовании агрегации тромбоцитов.

Формирование иммунного комплекса высшего порядка.

Методы ГФ-ВЭЖХ и DLS использовали для дополнительной оценки наличия иммунных комплексов высшего порядка, и приблизительного размера этих иммунных комплексов для разных антител к CD154, представленных в табл. 21, и shCD154. Поскольку shCD154 в растворе представляет собой тример, ожидаемое стехиометрическое соотношение антитела и тримера shCD154 в растворе составляет 3:1. В случае ГФ-ВЭЖХ более тяжелые и, следовательно, более большие иммунные комплексы должны иметь более короткое время удерживания, а более легкие и, следовательно, более мелкие иммунные комплексы должны иметь более длительные времена удерживания, за исключением очень больших иммунных комплексов, которые неспособны элюироваться из колонки и проявляются низким % извлечения. В случае DLS, чем больше значение радиуса (Rh), тем больше иммунный комплекс. Планшетные методики DLS не позволяют различать мономеры, димеры, тримеры и тетрамеры IgG. Таким образом, полученные значения Rh будут представлять собой средневзвешенное значение для мономера-тетрамера, следовательно, значения Rh, более близкие к 6,5 могут представлять собой растворы mAb, содержащие частицы высшего порядка, как правило, димер. Если связывание mAb с shCD154 является стехиометрическим, могут присутствовать два вида частиц - комплекс 3:1 (~ 500 кДа) и несвязанное антитело (~ 150 кДа), которые соответствуют значениям Rh ~ 8,8 нм и 5-6,5 нм для комплекса 3:1 и свободного mAb, соответственно. Ни одна методика не может точно определять молекулярную массу иммунных комплексов, но возможно получение сравнительных размеров. В табл. 23 показана взаимосвязь времени удерживания и гидродинамических радиусов с приблизительными молекулярными массами.

Таблица 23

Иммунный комплекс	Приблизительная молекулярная масса (кДа)	ГФ-ВЭЖХ Время удерживания (мин)	Гидродинамический радиус по DLS (нм)
mAb	150	~ 9 мин	От 5 до 6,5
mAb:shCD154 (тример)	550	~ 7 мин	~ 8,8
Иммунные комплексы высшего порядка	~ 1000	< 7 мин	~ 12

## DLS.

Размеры mAb в отсутствие CD154 и иммунного комплекса антитело: shCD154 оценивали в условиях, в которых комплексы антитело: shCD154 формировались в избытке антитела (молярное соотношение 10: 1) и при эквивалентной концентрации (молярное соотношение 1: 1). В условиях избытка антитела, антитело обычно насыщает участки CD154 с образованием иммунного комплекса и присутствует избыток несвязавшегося антитела. При эквивалентной концентрации свободное антитело или свободный shCD154 отсутствует. Значения Rh, полученные для каждого mAb в отсутствие shCD154 и при наличии shCD154 при молярных соотношениях 10: 1 и 10: 10, представлены в табл. 24.

Типичное mAb с номинальной MM 150 кДа дает значение Rh 5,0-6,5 нм. Димеры IgG, часто наблюдаемые при гель-фильтрационной хроматографии, нельзя различать методиками планшетного DLS. Полученные значения Rh будут представлять собой средневзвешенное значение мономера-тетрамера, следовательно, значения Rh, более близкие к 6,5, могут представлять собой растворы mAb, содержащие частицу высшего порядка, как правило, димер.

Для mAb в отсутствие CD154 наблюдали ожидаемые значения  $R_h$  5,5-6,3 нм для всех mAb, за исключением C4LB287 и C4LB234, для которых значения  $R_h$  составили 6,9, и 7,1 нм, соответственно, и это предполагает, что эти антитела имеют внутренне присущие тенденции к агрегации.

Значения Rh для комплексов антитело:shCD154, образованных при соотношении 10: 1, были по существу менее около 8,8 нм, что указывает на образование стехиометрического комплекса 3: 1 без образования иммунных комплексов высшего порядка, за исключением 5c8IgG2sigma (C4LB71) и C4LB234 (значения  $R_h$  составили 8,9 и 9,3 нм, соответственно), что указывает на образование иммунных комплексов высшего порядка.

Увеличение концентрации shCD154 до 10 мкМ приводило к появлению иммунных комплексов антитело: shCD154 с увеличенными Rh по сравнению с комплексами с 1 мкМ CD154 (соотношение антитела и CD154 составляло 10: 1). Некоторые комплексы антитело: shCD154 демонстрировали гетерогенность с присутствием вторичных частиц высокой молекулярной массы, в диапазоне от 7-25% от общей массы. Для IC C4LB71, 5c8IgG1, C4LB89, C4LB119, C4LB94, C4LB234 и C4LB289 значения Rh составляли 22,1, 61,5, 56,3, 45,0, 18,3, 18,7 и 19,6 нм, соответственно. Кроме этого, C4LB89, C4LB119, C4LB83, C4LB228 также формировали частицы 900-4000 нм, а C4LB89 и C4LB119 формировали преципитаты, указывающие на образование очень больших иммунных комплексов. Частицы с Rh около 12 нм обычно соответствуют массе ~ 1000 кДа, следовательно, эти mAb при этих условиях формируют очень большие иммунные комплексы с CD154.

Таблица 24

Антитело	Изотип	Гидродинамический радиус (Rh), нм		
		10: 0*	10: 1*	10: 10*
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	5,8	8,9	22,1
5c8IgG1	IgG1	5,7	8,3	19,6
C4LB89	IgG2σ	5,9	5,3, (4082)	615 ppt
C4LB231	IgG1σ	5,9	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	6,1	7,4	9,8
C4LB119	IgG2σ	6,3	8,0	56,3 ppt
C4LB290	IgG1σ	6,1	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	6,9	8,2	12,9
C4LB83	IgG2σ	6	6,1	14,5, (3632)
C4LB288	IgG1	6,1	6,6	10,9
C4LB94	IgG2σ	6,1	6,9	45
C4LB234	IgG1σ	7,1	9,3, (83)	5,3, (18,3)
C4LB289	IgG1	5,6	7,8, (17, 1350)	3,7, (18,7)
*Соотношение антитела и shCD154				
Rh вторичных частиц указаны в скобках, если % масс. составил ≥ 25%				
ppt: из раствора выпадал осадок				
IgG2σ: IgG2sigma				
IgG1σ: IgG1sigma				

## ГФ-ВЭЖХ.

В табл. 25 представлено время удерживания, доля извлечения и оценочная молекулярная масса (ММ) антител к CD154 отдельно или в иммунном комплексе с shCD154 по данным анализа ГФ-ВЭЖХ. Типичное антитело имело ММ около 150 кДа, а тример shCD154 имел ММ около 50 кДа. Следовательно, комплекс mAb:тример shCD154 со стехиометрическим отношением 3: 1 имеет ожидаемую ММ около 500 кДа.

Таблица 25

Идентификатор mAb	Тип	Соотношение*	Время удерживания (мин)	Площадь пика	% извлечения	ММ (кДа)
5c8IgG2σ	IgG2σ	1: 1	6,24	6887	85,2	1596,8
(C4LB71)		10: 1	6,28	7348	90,9	1538,2
5c8IgG1	IgG1	1: 1	7,3	1096	55,7	592,8
		10: 1	6,92	3280	69,2	845,6
C4LB89	IgG2σ	1: 1	6,19	356	16,9**	1673,2
		10: 1	6,35	3662	45,3**	1440,8
C4LB231	IgG1σ	1: 1	6,97	6766	83,8	807
		10: 1	6,97	7181	88,9	807
C4LB237	IgG1	1: 1	6,99	6506	80,5	792,1
		10: 1	6,99	7977	98,7	792,1
C4LB119	IgG2σ	1: 1	9,59	307	5,6**	69,7
		10: 1	8,02	4667	8,3**	302,4
C4LB290	IgG1σ	1: 1	7,01	4957	61,4	777,4
		10: 1	7,01	6983	86,4	777,4
C4LB287	IgG1	1: 1	7	5937	73,5	784,7
		10: 1	7,02	8011	99,2	770,2
C4LB83	IgG2σ	1: 1	7,86	5193	64,3	351,2
		10: 1	7,84	3355	86,9	357,8
C4LB288	IgG1	1: 1	7,62	4169	70,6	439,5
		10: 1	7,37	5582	95,5	555,2
C4LB94	IgG2σ	1: 1	6,01	3233	40,0**	1979,9
		10: 1	6,02	7748	95,9	1961,5
C4LB234	IgG1σ	1: 1	6,26	5534	86,6	1567,3
		10: 1	6,53	7922	98,1	1217,6
C4LB289	IgG1	1: 1	6,25	5800	83,5	1582
		10: 1	6,53	7958	98,5	1217,6
* (mAb: CD154)						
**Степень извлечения < 50%						
Антитела с идентичными VH/VL разбиты на группы, разделенные пустыми строками						
IgG2σ: IgG2sigma						
IgG1σ: IgG1sigma						

Все антитела формировали иммунный комплекс с shCD154. C4LB231, C4LB237, C4LB290, C4LB287 (все IgG1sigma) формировали иммунный комплекс с SCD154 и элюировались на 7,0 мин. Однако C4LB290 и C4LB287 имели более низкий % извлечения в условиях 1: 1 по сравнению с условиями 10: 1, тогда как C4LB231 и C4LB237 имели более высокий % извлечения (> 80%). C4LB289 (IgG1), C4LB234 (IgG1sigma), 5c8IgG1sigma (C4LB71) и C4LBB94 (IgG2sigma) элюировались раньше, на 6,2-6,5 мин, что указывает на образование вышеупомянутыми mAb более больших комплексов. 5c8IgG1 имело более широкий пик на ожидаемом времени удерживания для иммунного комплекса mAb: тример shCD154 3: 1, однако широкий пик и меньшая степень извлечения (56% в условиях 1: 1) указывает на возможное образование иммунных комплексов высшего порядка, которые не могли ни вступить во взаимодействие с колонкой или ни войти в нее. C4LB89 и C4LB119 (оба IgG2sigma) формировали иммунный комплекс с shCD154 и элюировались с широким пиком и очень низким извлечением (6-17% в условиях 1: 1), вероятно, вследствие образования больших комплексов, не входящих в колонку. Как правило, антитела на изотипах IgG2sigma формировали более большие иммунные комплексы по сравнению с антителами на IgG1sigma или IgG1.

В табл. 26 показаны сводные данные по характеристикам антител. В общем, данные по активации тромбоцитов, данные ГФ-ВЭЖХ и DLS, в совокупности, указывают, что активация тромбоцитов не пол-

ностью обусловлена активным Fc. Данные указывают, что антитела с заглушенным Fc, такие как IgG1sigma и IgG2sigma, способны формировать более большие иммунные комплексы, больше, чем ожидаемый комплекс mAb и тримера shCD154 3: 1, и что некоторые антитела на заглушенном Fc способны к активации тромбоцитов. Эти данные подтверждают вывод, что в активации тромбоцитов участвуют как домены VH/VL (например, эпитоп, с которым связывается антитело), так и формирование иммунных комплексов высшего порядка.

Таблица 26

Антитело	Изотип	Активация тромбоцитов**	Активация тромбоцитов, независимая от FcγRIIa	IC, RT по ГФ-ВЭЖХ (мин)		IC, Rh (нм) по DLS	
				10:1*	1:1*	10:1*	10:10*
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	Нет		6,3	6,2	8,9	22,1
5c8IgG1σ	IgG1σ	Нет					
5c8IgG1	IgG1	Да	Нет	6,9	7,3	8,3	19,6
C4LB89	IgG2σ	Нет		6,4 <sup>#</sup>	6,2 <sup>#</sup>	5,3, 4082 <sup>^</sup>	615 p
C4LB231	IgG1σ	Нет		7,0	7,0	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	Нет		7,0	7,0	7,4	9,8
C4LB119	IgG2σ	Да	Да	8,0 <sup>#</sup>	9,6 <sup>#</sup>	8,0	56,3 p
C4LB290	IgG1σ			7,0	7,0	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	Да	Нет	7,0	7,0	8,2	12,9
C4LB83	IgG2σ	Незначит.	Да	7,8	7,9	6,1	14,5, 3632 <sup>^</sup>
C4LB288	IgG1	Да	Нет	7,4	7,6	6,6	10,9
C4LB94	IgG2σ	Да	Да	6,0	6,0 <sup>#</sup>	6,9	45
C4LB234	IgG1σ			6,5	6,3	9,3	5,3, 18,3 <sup>^</sup>
C4LB289	IgG1	Да	Нет	6,5	6,3	7,8	3,7, 18,7

\*Соотношение антитела и shCD154  
\*\*Оценка по экспрессии либо PAC-1, либо CD62p  
<sup>#</sup>% извлечения в ГФ-ВЭЖХ < 50%  
<sup>^</sup>Rh вторичных частиц указывались, если % масс. ≥ 25%  
p: из раствора выпадал осадок  
IgG2σ: IgG2sigma  
IgG1σ: IgG1sigma

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело-антагонист или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с CD154 человека с SEQ ID NO:1, и содержащее определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1 с SEQ ID NO:37 (RASQSISSYLN), LCDR 2 с SEQ ID NO:44 (YANSLQS) и LCDR 3 с SEQ ID NO:52 (QQSDSIPWT), определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1 с SEQ ID NO:17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO:23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) и HCDR3 с SEQ ID NO:30 (SRYYGDLDY)

2. Выделенное антитело-антагонист или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с CD154 человека с SEQ ID NO:1, и содержащее HCDR 1 с SEQ ID NO:17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO:23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 с SEQ ID NO:30 (SRYYGDLDY), LCDR1 с SEQ ID NO:37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO:49 (YASSLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO:52 (QQSDSIPWT).

3. Выделенное антитело-антагонист или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с CD154 человека с SEQ ID NO:1, и содержащее HCDR1 с SEQ ID NO:17 (SYGIS), HCDR2 с SEQ ID NO:23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 с SEQ ID NO:30 (SRYYGDLDY), LCDR1 с SEQ ID NO:37 (RASQSISSYLN), LCDR2 с SEQ ID NO:50 (YANTLQS) и LCDR3 с SEQ ID NO:52 (QQSDSIPWT).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антитело обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

а) иммунный комплекс антитела и растворимого CD154 человека (shCD154) не активирует тромбо-

циты, если активация тромбоцитов измеряется по экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов;

b) связывается с CD154 с константой диссоциации (KD), равной около  $5 \times 10^{-9}$  М или менее, если KD измеряют с использованием системы ProteOn XPR36 при 25°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко, содержащем 0,03% полисорбата P20 и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина;

c) ингибирует опосредованную CD154 пролиферацию В-клеток человека со значением  $IC_{50}$  около  $2,7 \times 10^{-9}$  М или менее; или

d) ингибирует опосредованную CD154 экспрессию секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) под действием индуцируемого NF-κB минимального промотора интерферона-β (IFN-β) в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих SEAP и человеческий CD40 со значением  $IC_{50}$ , равным около  $2,1 \times 10^{-8}$  М или менее.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где CD154 представляет собой гомотример и антитело связывает первый мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 182-207 CD154 и второй мономер CD154 в гомотримере в пределах аминокислотных остатков 176-253 CD154, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO:1.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело связывает остатки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 и R207 в первом мономере CD154, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO:1.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело связывает остатки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 и F353 во втором мономере CD154, где нумерация остатков соответствует SEQ ID NO:1.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO:59.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, содержащее варибельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO:66, 72 или 73.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащее VH с SEQ ID NO:59 и VL с SEQ ID NO:66.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащее VH с SEQ ID NO:59 и VL с SEQ ID NO:72.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, содержащее VH с SEQ ID NO:59 и VL с SEQ ID NO:73.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, где антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, содержащее по меньшей мере одну замену в Fc-области, где по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замену L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S или P331S, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.14, содержащее замены L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S или P331S в области Fc, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, содержащее по меньшей мере одну замену в области Fc, где по меньшей мере одна замена в области Fc представляет собой замену V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S или P331S, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.16, содержащее замены V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S в области Fc, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.13, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO:

a) 80 и 81, соответственно;

b) 82 и 81, соответственно или

c) 83 и 81, соответственно.

19. Мультиспецифичное антитело, отличающееся тем, что содержит антитело по любому из пп.1-3.

20. Выделенное антагонистическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающее CD154 с SEQ ID NO:1, содержащее

a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO:17, 23, 30, 37, 44 и 52, соответственно;

b) VH с SEQ ID NO:59 и VL с SEQ ID NO:66 или

c) тяжелую цепь с SEQ ID NO:80 и легкую цепь с SEQ ID NO:81.

21. Иммуноконъюгат, специфически связывающийся с CD154 человека с SEQ ID NO:1, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, связанные с терапевтическим агентом.

22. Иммуноконъюгат, специфически связывающийся с CD154 человека с SEQ ID NO:1, содержа-

щий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, связанные с визуализирующим агентом.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8.

25. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9.

26. Полинуклеотид по п.24, содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:76 или 77.

27. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.10-12.

28. Вектор для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащий полинуклеотид по любому из пп.24-27.

29. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.28.

30. Способ продуцирования выделенного антагонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD154 с SEQ ID NO:1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.29 в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

31. Способ лечения аутоиммунного заболевания или иммуноопосредованного воспалительного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20 требующему лечению пациенту в течение времени, достаточного для лечения аутоиммунного заболевания или иммуноопосредованного воспалительного заболевания.

32. Способ по п.31, в котором иммуноопосредованное воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание представляет собой артрит, системную красную волчанку (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, реакции при трансплантации, реакции при трансплантации почки, реакции при трансплантации кожи, реакции при трансплантации костного мозга, реакцию "трансплантат против хозяина" (РТПХ), иммунную тромбоцитопению (ИТР), рассеянный склероз, тиреоидит, диабет I типа или атеросклероз.

33. Способ по п.32, в котором артрит представляет собой ревматоидный артрит, ювенильный артрит, псориатический артрит, синдром Рейтера, анкилозирующий спондилит или подагрический артрит.

34. Способ по п.32, в котором аутоиммунное заболевание или иммуноопосредованное воспалительное заболевание представляет собой волчанку.

35. Способ по п.32, в котором аутоиммунное заболевание или иммуноопосредованное воспалительное заболевание связано с трансплантацией.

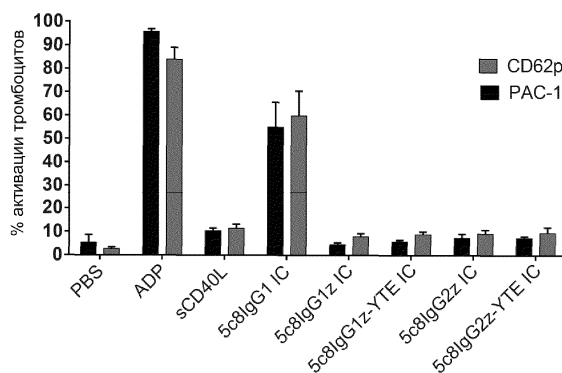
36. Способ по п.32, в котором аутоиммунное заболевание или иммуноопосредованное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК).

37. Способ по п.36, в котором ВЗК представляет собой болезнь Крона или язвенный колит.

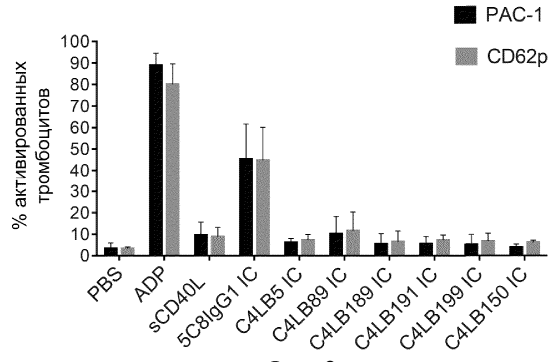
38. Способ по п.31, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента, где второй терапевтический агент представляет собой нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), салицилаты, гидроксихлорохин, сульфасалазин, кортикостероиды, цитотоксические лекарственные средства и/или иммуносупрессорные лекарственные средства.

39. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-20 для лечения аутоиммунного заболевания или иммуноопосредованных воспалительных состояний.

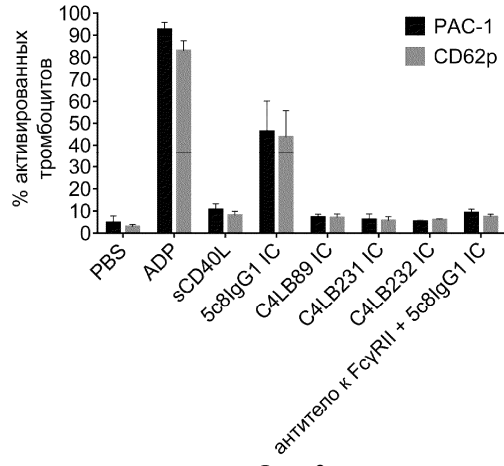
40. Антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с антителом по любому из пп.1-3.



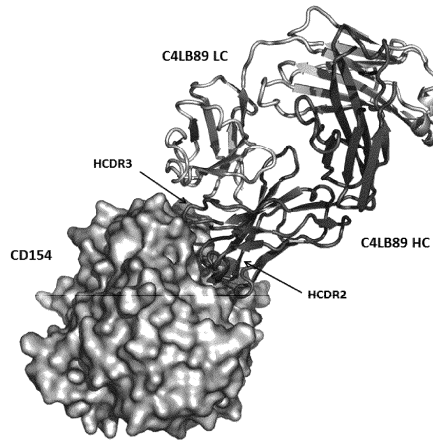
Фиг. 1



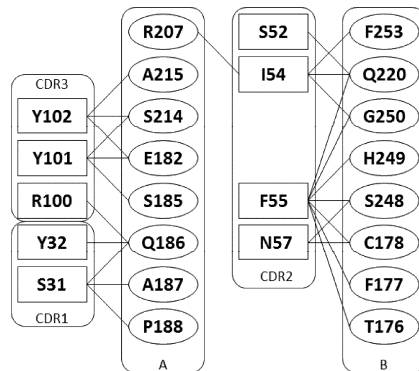
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



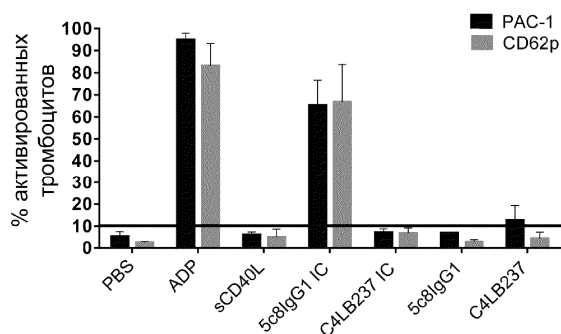
Фиг. 5

	1	30
Человек	MIETYNQTS <del>PR</del> SAATGLPISMKIFMYLLTV	
Игрунка	MIETYNQPV <del>PR</del> SAATGPPVSMKIFMYLLTV	
	***** . ***** * .*****	
	31	60
Человек	FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH	
Игрунка	FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH	
	*****	
	61	90
Человек	EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ	
Игрунка	EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ	
	*****	
	91	120
Человек	FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP	
Игрунка	FEGFVKDIMLNKEEKKENSFEMQKGDQNP	
	***** . *****	
	121	150
Человек	QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN	
Игрунка	QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN	
	*****	
	151	180
Человек	NLV <del>T</del> LENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN	
Игрунка	NLV <del>T</del> LENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN	
	*****	

Фиг. 6А

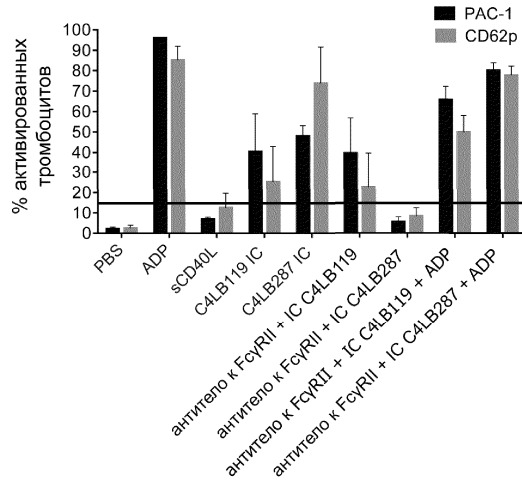
	181	210
Человек	REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAAN	
Игрунка	REASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAAN	
	***** . *	
	211	240
Человек	THSSAKPCGQ <del>Q</del> SIHLGGVFELQPGASVFN	
Игрунка	THSSAKPCGQ <del>Q</del> SIHLGGIFELQPGASVFN	
	***** . *****	
	241	261
Человек	VTDP <del>S</del> QVSHGTGFTSFGLLKL	
Игрунка	VTDP <del>S</del> QVSHGTGFTSFGLLKL	
	*****	

Фиг. 6В

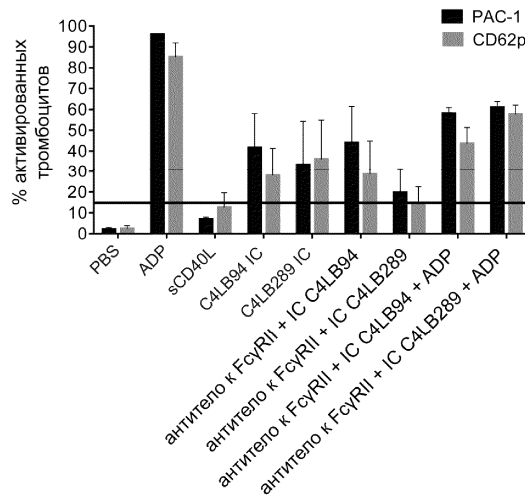


Фиг. 7

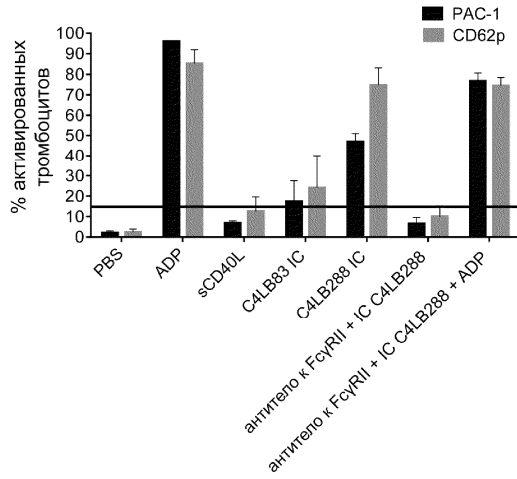




Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С

