

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042934**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.05

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

(21) Номер заявки
201892362

(22) Дата подачи заявки
2017.04.18

(54) АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С CD40 ЧЕЛОВЕКА, И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/324,170

(32) 2016.04.18

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/028162

(87) WO 2017/184619 2017.10.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЛДЕКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Келер Тибор, Голдстейн Джоел,
Вигале Лаура А., Хе Лижен, О'Нилл
Том, Крокер Андреа, Сундарапандиян
Каруна, Томас Лоуренс Дж., Виджер
Дженифер (US)

(74) Представитель:
Квашнин В.П. (RU)

(56) R. H. VONDERHEIDE ET AL: "Agonistic CD40 Antibodies and Cancer Therapy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 1035-1043, XP055218372, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2064 page 1039, left-hand column, paragraph 3 - page 1040, left-hand column, paragraph 1 page 1041, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2
WO-A1-2014070934

SARA M MANGSBO ET AL: "ADC-1013, an agonistic CD40 antibody optimized for local immunotherapy of cancer", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 1, no. Suppl 1, 7 November 2013 (2013-11-07), page P42, XP021167252, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-1-S1-P42 the whole document

L. C. SANDIN ET AL: "Locally Delivered CD40 Agonist Antibody Accumulates in Secondary Lymphoid Organs and Eradicates Experimental Disseminated Bladder Cancer", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 80-90, XP055218221, ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0067 figures 1-5

R. S. DRONCA ET AL: "Immunomodulatory Antibody Therapy of Cancer: The Closer, the Better", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 21, no. 5, 28 October 2014 (2014-10-28), pages 944-946, XP055397745, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2111 the whole document

WO-A1-2010032061

WO-A2-2006068953

(57) Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным агонистическим антителам, которые связываются с CD40 человека, и к соответствующим композициям и молекулам на основе антител. Настоящее изобретение также относится к терапевтическим и диагностическим способам применения указанных антител.

B1

042934

042934 B1

Родственная заявка

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/324170, поданной 18 апреля 2016 г. Содержание вышеупомянутой заявки включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Уровень техники

Взаимодействия между Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками вовлекают множество вспомогательных молекул, которые облегчают развитие иммунного ответа. Одной из таких молекул является CD40, член супер семейства рецепторов факторов некроза опухолей (TNF-R), который связывается с CD40L (Ranheim EA, et al., Blood. 1995 June 15; 85(12):3556-65). CD40 представляет собой трансмембранный гликопротеин массой 43-48 кДа, состоящий из 277 аминокислотных остатков (Braesch-Andersen et al., 1989). CD40 экспрессируется антигенпрезентирующими клетками (АПК), и связывание его природного лиганда (CD40L) на Т-клетках активирует АПК, включая дендритные клетки и В-клетки (Khalil and Vonderhide (2007) Update Cancer Ther, 2(2): 61-65), усиливая тем самым иммунные ответы. CD40 также экспрессируется на многих опухолевых клетках, и в этом случае его лигирование обуславливает непосредственное цитотоксическое действие, например, вовлечение CD40 на опухолевых клетках приводит к апоптозу в условиях *in vitro* и нарушению роста опухоли в условиях *in vivo* (Tai et al. (2004) Cancer Res, 64(8):2846-52).

Моноклональные антитела против CD40 обеспечивают ряд потенциальных терапевтических целей, включая лечение различных видов рака. Например, было показано, что агонистические антитела к CD40 заменяют помощь Т-клеток, обеспеченную CD4 лимфоцитами в мышинных моделях опосредуемого Т-клетками иммунитета, и у хозяев, несущих опухоли, агонисты CD40 запускают эффективные иммунные ответы против ассоциированных с опухолью антигенов (Bennett et al. (1998) Nature, 393(6684):478-80). Помимо этого антитела к CD40 являются очень перспективными для применения в вакцинах (Fransen et al. (2014) Vaccine 32:1654-1660). Тем не менее, существуют потенциальные нежелательные эффекты, связанные с агентами, которые сильно модулируют иммунную систему (Sandin et al. (2014) Cancer Immunol Res, 2:80-90). Соответственно, существует потребность в более глубоком понимании специфических свойств и механизмов, которые делают антитела к CD40 терапевтически эффективными, а также в улучшенных терапевтических антителах против CD40, которые можно применять для лечения и/или предотвращения заболеваний.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам к CD40, обладающим конкретными функциональными свойствами, которые могут быть связаны с полезными и желательными терапевтическими эффектами. В частности, были получены и охарактеризованы агонистические моноклональные антитела (МАТ) к CD40, способные повышать иммунный ответ на антиген (например, антиген, экспрессируемый на клетке). В настоящем документе термин "антитело" относится к полноразмерным антителам и их антигенсвязывающим частям.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела к CD40 усиливают иммунные ответы против антигена, например, путем усиления опосредуемых Т-клетками иммунных ответов, активации В-клеток и/или выработки цитокинов. Антитела могут быть введены по отдельности или в составе различных видов комбинированной терапии (например, в комбинации с вакцинной терапией и/или химиотерапией).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела к CD40 способны увеличивать иммунный ответ на антиген без индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) CD40-экспрессирующих клеток и/или комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ) CD40-экспрессирующих клеток.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела содержат константную область, не обладающую эффекторными функциями. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения константная область представляет собой изотип IgG2 (например, IgG2 человека).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела к CD40 проявляют одно или более из следующих свойств:

- (a) не способны блокировать связывание CD40L с CD40 человека, независимо от связывания с рецептором Fc;
- (b) способны блокировать связывание CD40L с CD40 человека, независимо от связывания с рецептором Fc;
- (c) активируют CD40 человека, экспрессируемый на антигенпрезентирующей клетке (АПК), независимо от связывания с рецептором Fc;
- (d) индуцируют апоптоз опухолевой клетки;
- (e) обладают активностью, направленной на стимуляцию Т-клеток;
- (f) способны усиливать активацию В-клеток; и/или
- (g) способны к синергическому действию с CD40L.

Предпочтительно антитела действуют независимо от взаимодействия с рецептором Fc. Предпочтительно антитела представляют собой антитела изотипа IgG2.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агонистические антитела способны увеличивать иммунный ответ независимо от связывания с рецептором Fc. Например, антитела могут проявлять сильные агонистические признаки без перекрестного связывания с рецептором Fc, таким как FcγR. Такие агонистические признаки включают, например, увеличение активности Т-клеток и/или увеличение активации В-клеток, согласно результатам измерения, например, на основании увеличения экспрессии маркеров клеточной поверхности, выбранных из группы, состоящей из HLA-DR V450, CD54-ФЭ, CD86-АФЦ, CD83 BV510, CD19 V500, CD54-ФЭ, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69-АФЦ, CD86-АФЦ, CD38 и CD71-ФЭ.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела блокируют связывание CD40 с CD40L (CD154) на CD40-экспрессирующих клетках. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения антитела ингибируют связывание растворимого CD40L с CD40-экспрессирующими клетками по меньшей мере приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения антитело к CD40 ингибирует связывание CD40L по меньшей мере приблизительно на 70%, согласно результатам измерения, например, методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), интерферометрии биослоев (BLI) или с помощью системы Viacore. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к CD40 ингибирует связывание CD40L по меньшей мере приблизительно на 80%, согласно результатам измерения, например, методами FACS, BLI или с помощью системы Viacore.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела индуцируют апоптоз клеток, согласно результатам измерения, например, на основании увеличения экспрессии CD95. Антитела также могут быть сконструированы так, чтобы включать область Fc, которая специфична в отношении конкретного рецептора Fc (например, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB1 (CD32), FcγRIIB2 (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR и FcRn).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела способны связываться с CD40 человека с равновесной константой диссоциации K_d, составляющей 10⁻¹⁰ М или менее, предпочтительно 10⁻¹⁰ М или менее и/или перекрестно реагировать с CD40 яванских макаков.

Конкретные антитела к CD40 согласно настоящему изобретению включают антитела 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 3B6-NS, и связанные с ними варианты реализации, описанные ниже.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела содержат последовательность гипервариабельного участка (CDR) 3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 10, 23, 24, 37, 38, 51, 52, 65, 66, 65, 66, 79, 80, 93, 94, 107, 108, включая консервативные модификации этих последовательностей (например, консервативные замены аминокислот). Антитела могут дополнительно содержать последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 16, 29, 30, 43, 44, 57, 58, 71, 72, 85, 86, 99, 100, 113, 114, включая консервативные модификации этих последовательностей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательности CDR2 и/или CDR1 тяжелой цепи выбраны из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 7, 8, 21, 22, 35, 36, 49, 50, 63, 64, 77, 78, 91, 92, 105, 106 и SEQ ID NO: 5, 6, 19, 20, 33, 34, 47, 48, 61, 62, 61, 62, 75, 76, 89, 90, 103, 104, соответственно, включая консервативные модификации этих последовательностей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательности CDR2 и/или CDR1 легкой цепи выбраны из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 13, 14, 27, 28, 41, 42, 55, 56, 69, 70, 84, 85, 97, 98, 111, 112 и SEQ ID NO: 11, 12, 25, 26, 40, 41, 53, 54, 67, 68, 81, 82, 95, 96, 109, 110, соответственно, включая консервативные модификации этих последовательностей.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 17, 31, 45, 59, 73, 87, 101, включая консервативные модификации этих последовательностей. Антитела могут дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 18, 32, 46, 60, 74, 88, 102, включая консервативные модификации этих последовательностей.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела содержат вариабельные области тяжелой и/или легкой цепей, соответственно, содержащие следующие аминокислотные последовательности (включая консервативные модификации последовательностей):

- (a) SEQ ID NO: 3 и/или 4;
- (b) SEQ ID NO: 17 и/или 18;
- (c) SEQ ID NO: 31 и/или 32;
- (d) SEQ ID NO: 45 и/или 46;
- (e) SEQ ID NO: 59 и/или 60;
- (f) SEQ ID NO: 73 и/или 74;
- (g) SEQ ID NO: 87 и/или 88; или
- (h) SEQ ID NO: 101 и/или 102.

Настоящее изобретение также относится к антителам, которые содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей, последовательности которых по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 96%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% или более идентичны любой из вышеуказанных последовательностей. Диапазоны, которые являются промежуточными по отношению к перечисленным выше значениям, например, вариабельные области тяжелой и легкой цепей, последовательности которых по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-100% идентичны любой из вышеуказанных последовательностей, также включены в объем настоящего изобретения.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела связываются с CD40 человека и содержат последовательности CDR из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, соответственно, содержащих аминокислотные последовательности, приведенные в

- (a) SEQ ID NO: 3 и 4;
- (b) SEQ ID NO: 17 и 18;
- (c) SEQ ID NO: 31 и 32;
- (d) SEQ ID NO: 45 и 46;
- (e) SEQ ID NO: 59 и 60; или
- (f) SEQ ID NO: 73 и 74;
- (g) SEQ ID NO: 87 и 88; или
- (h) SEQ ID NO: 101 и 102

(в каждом случае включая одну консервативную модификацию последовательности, две консервативные модификации последовательности или вплоть до трех, вплоть до четырех или вплоть до пяти консервативных модификаций последовательности в одном или более CDR).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела связываются с CD40 человека и содержат:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 7, 9, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 11, 13, 15, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19, 21, 23, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25, 27, 29, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 33, 35, 37, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 39, 41, 43, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 47, 49, 51, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 53, 55, 57, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 61, 63, 65, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 67, 69, 71, соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 75, 77, 79, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81, 83, 85, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 89, 91, 93, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 95, 97, 99, соответственно; или

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 103, 105, 107, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 109, 111, 113, соответственно (в каждом случае необязательно включая одну консервативную модификацию последовательности, две консервативные модификации последовательности или вплоть до трех, вплоть до четырех или вплоть до пяти консервативных модификаций последовательности в одном или более указанных CDR).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела связываются с CD40 человека и содержат:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 6, 8, 10, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 12, 14, 16, соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 22, 24, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 26, 28, 30, соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 34, 36, 38, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 40, 42, 44, соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 48, 50, 52, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 54, 56, 58, соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 62, 64, 66, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 68, 70, 72, соответственно; или

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 76, 78, 80, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 82, 84, 86, соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 90, 92, 94, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 96, 98, 100, соответственно; или

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 104, 106, 108, соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 110, 112, 114, соответственно (в каждом случае необязательно включая одну консервативную модификацию последовательности, две консервативные модификации последовательности или вплоть до трех, вплоть до четырех или вплоть до пяти консервативных модификаций последовательности в одном или более указанных CDR).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителам, которые конкурируют за связывание с CD40 с конкретными антителами, описанными выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело конкурирует за связывание с CD40 с антителом, содержащим вариабельные области тяжелой и/или легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3 и 4, SEQ ID NO: 17 и 18, SEQ ID NO: 31 и 32, SEQ ID NO: 45 и 46, SEQ ID NO: 59 и 60, SEQ ID NO: 73 и 74, SEQ ID NO: 87 и 88, SEQ ID NO: 101 и 102, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп на CD40, распознаваемый специфическими антителами, описанными выше. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD40, распознаваемым антителом, содержащим вариабельные области тяжелой и/или легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3 и 4, SEQ ID NO: 17 и 18, SEQ ID NO: 31 и 32, SEQ ID NO: 45 и 46, SEQ ID NO: 59 и 60, SEQ ID NO: 73 и 74, SEQ ID NO: 87 и 88, SEQ ID NO: 101 и 102, соответственно. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывается с тем же эпитопом, как и антитело 3C3 или 3G5.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с одним или более остатками в пределах участка, содержащего остатки аминокислот 1-5 и 33-36 внеклеточного домена (ВКД) CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела также связываются с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из аминокислот 25, 26, 28 и 30 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела связываются с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из аминокислот 5, 33, 34 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела связываются с аминокислотами 5, 33 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела связываются с аминокислотами 5, 33, 34 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133).

Согласно любому из вышеперечисленных аспектов настоящее изобретение относится к антителам, в которых замена аланина треонином в положении 5 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133) снижает связывание антител по меньшей мере на 30% по сравнению со связыванием с ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замена аланина треонином в положении 5 ВКД CD40 человека снижает связывание антител по меньшей мере на 50% по сравнению со связыванием с ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения замена аланина треонином в положении 5 ВКД CD40 человека снижает связывание антител по меньшей мере на 80% по сравнению со связыванием с ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133).

Согласно любому из вышеперечисленных аспектов настоящее изобретение относится к антителам, которые проявляют синергическое действие с CD40L, который может представлять собой эндогенный CD40L. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синергическое действие представляет собой увеличенную индукцию экспрессии CD95 при инкубации с клетками линии Ramos.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синергическое действие представляет собой увеличение пролиферации В-клеток при инкубации с В-клетками человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синергическое действие представляет собой увеличенную индукцию экспрессии ИЛ-12p40 при инкубации с дендритными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения синергическое действие измеряют на основании экспрессии CD95.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с одним или более остатками в пределах участка, содержащего остатки аминокислот 13-15 и 33-36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела связываются с одной или более аминокислотами, выбранными из группы, состоящей из аминокислот 33, 34 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133).

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть полноразмерными, например, антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD и IgE или их варианты. В другом варианте антитела могут представлять собой фрагменты, такие как Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv, выделенный гипервариабельный участок (CDR) или комбинацию двух или более выделенных CDR. Антитела могут относиться к любому известному типу или виду антител, включая, но не ограничиваясь указанными, полностью антитела человека, гуманизированные и химерные антитела. Предпочтительно антитела представляют собой антитела IgG2. Следует понимать, что некоторые модификации могут быть внесены в последовательность IgG2, такие как делеция N-концевого лизина и/или различные другие мутации, известные в данной области техники. Следовательно, антитело IgG2 включает, например, антитела, содержащие константные домены, последовательности которых по меньшей мере на 90%, предпочтительно по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 97% и предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичны нативной последовательности IgG2 человека.

Настоящее изобретение также относится к молекулярным конъюгатам, содержащим антитело согласно настоящему изобретению, соединенное с антигеном (включая фрагменты, эпитопы и антигенные детерминанты), таким как опухолевый антиген, аутоантиген или компонент патогена. Например, антиген может включать опухолевый антиген, такой как β hCG, gp100 или Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотип, тирозиназа, теломераза, SSX2, MUC-1, MAGE-A3 и ассоциированный с меланомой высокомолекулярный антиген (HMW-MAA) MART1, мелан-А, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2, мезотелин или ассоциированный с меланомой высокомолекулярный антиген (HMW-MAA).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекулярный комплекс дополнительно содержит терапевтический агент, такой как цитотоксический агент, иммуносупрессорный агент или химиотерапевтический агент.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим антитела согласно настоящему изобретению, соединенные со вторым функциональным фрагментом, имеющим отличающуюся специфичность связывания. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вторая молекула может связываться с рецептором Т-клеток (например, CD3, CD40 или CTLA-4), рецептором NK-клеток (например, CD56), рецептором В-клеток (например, CD20) или другим рецептором фактора некроза опухоли (например, CD95).

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим антитела, молекулярные конъюгаты или биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе, приготовленным с фармацевтически приемлемым носителем. Композиции могут дополнительно содержать адъювант, иммуностимулирующий агент (например, лиганд CD40, лиганд FLT 3, цитокины, колониестимулирующие факторы, антитело к CTLA-4 (включая, но не ограничиваясь им, ипилимумаб), антитело к PD1 (включая, но не ограничиваясь им, MPDL3280A или дурвалумаб), антитело к 41BB, антитело к OX-40, LPS (эндотоксин), оцПНК, дцПНК, бациллу Кальметта-Герена (BCG), гидрохлорид левамизола, внутривенные иммунные глобулины и агонист Toll-подобного рецептора (TLR) (например, агонист TLR3, такой как поли-IC, агонист TLR4, агонист TLR5, агонист TLR7, агонист TLR8 и агонист TLR9)), иммуносупрессорный агент, другое антитело или антиген или агонист STING.

Опухолевые антигены, которые могут быть включены в молекулярные конъюгаты или композиции согласно настоящему изобретению (например, в вакцине, применяемой в комбинации с антителом к CD40 согласно настоящему изобретению), включают любой антиген или антигенную детерминанту, которая присутствует (или ассоциирована с ней) на опухолевой клетке, но не на обычных нормальных клетках, или антиген или антигенную детерминанту, которая присутствует или ассоциирована с опухолевыми клетками в большем количестве, чем на нормальных (неопухолевых) клетках, или антиген или антигенную детерминанту, которая присутствует на опухолевых клетках в иной форме, чем на нормальных (неопухолевых) клетках. Такие антигены включают опухолеспецифические антигены, включая опухолеспецифические мембранные антигены, ассоциированные с опухолью антигены, включая ассоциированные с опухолью мембранные антигены, эмбриональные антигены на опухолях, рецепторы факторов роста, лиганды факторов роста и любой другой тип антигена, который ассоциирован с раком. Опухолевый антиген может представлять собой, например, антиген эпителиального рака (например, рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, рака легких), специфический антиген предстательной железы (PSA) или специфический мембранный антиген предстательной железы (PSMA), антиген рака мочевого пузыря, антиген рака легких (например, мелкоклеточного рака легких), антиген рака прямой кишки, антиген рака яичников, антиген рака мозга, антиген рака желудка, антиген карциномы почек, антиген рака поджелудочной железы, антиген рака печени, антиген рака пищевода, антиген рака головы и шеи или антиген колоректального рака. Например, антиген может включать опухолевый антиген, такой

как β hCG, gp100 или Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотип, тирозиназа, теломераза, SSX2, MUC-1, MAGE-A3 и ассоциированный с меланомой высокомолекулярный антиген (HMW-MAA) MART1, мелан-А, EGFRvIII, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2 или мезотелин. Другие антигены, применяемые согласно настоящему изобретению (например, в вакцине, применяемой в комбинации с антителом к CD40 согласно настоящему изобретению), включают антигены патогенов, вызывающих инфекционные заболевания, таких как вирусы, бактерии, паразиты и грибки, примеры которых раскрыты в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих все или части вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей антител согласно настоящему изобретению, а также к векторам экспрессии, содержащим такие нуклеиновые кислоты, и клеткам-хозяевам, содержащим такие векторы экспрессии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательности нуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 87-112, соответственно, или последовательностей нуклеиновых кислот, которые, например, по меньшей мере на 85, 90 или 95% идентичны указанным последовательностям нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение также относится к способам усиления иммунного ответа (например, опосредуемого Т-клетками иммунного ответа и/или опосредуемого НК-клетками ответа, и/или опосредуемого В-клетками иммунного ответа) против антигена у субъекта с применением агонистических антител, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитела связываются с CD40 человека (который экспрессируется на множестве типов иммунных клеток), запуская тем самым пролиферацию и активацию антигенпрезентирующих клеток (АПК) и активируя В-клетки, а также эффекторные Т-клетки и Т-клетки памяти, что приводит к усилению иммунных ответов, например, против опухолевых клеток. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способы включают введение антитела (например, полноразмерного антитела или его антигенсвязывающей части), композиции или биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа против антигена. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы дополнительно включают введение антигена, например, одновременно, по отдельности или после антитела, композиции или биспецифической молекулы.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования размножения CD40-экспрессирующих клеток (например, при лечении рака). Например, было показано, что агонистические антитела согласно настоящему изобретению увеличивают экспрессию поверхностных молекул клетки, которые привлекают иммунные эффекторные клетки, что приводит к гибели клеток, например, апоптозу. Следовательно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способ включает введение или приведение в контакт с клетками антитела (например, полноразмерного антитела или его антигенсвязывающей части), композиции или биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению в количестве, эффективном для ингибирования размножения CD40-экспрессирующих клеток.

Настоящее изобретение также относится к способам нацеливания антигена на клетку, например, клетку, способную представлять антиген (например, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), моноциты (такие как THP-1), В-лимфобластные клетки (такие как C1R.A2, 1518 B-LCL) и ДК моноцитарного происхождения), у субъекта путем введения молекулы, которая связывается с рецептором на клетке (например, ранее описанные антитела к CD40), соединенной с антигеном.

Способы, описанные в настоящем документе, можно применять при лечении различных заболеваний, в частности, разных видов рака (например, рака, выбранного из группы, включающей лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, такой как миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелобластный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, первичную лимфому центральной нервной системы, лимфому Беркитта, В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, болезнь Ослера, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, остеосаркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, саркому толстой кишки, колоректальную карциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, карциному базальных клеток, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, карциному почек, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильма, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичек, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, немелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, неврому слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, карциному носоглотки, карциному пищевода, базальноклеточный рак, рак желчных путей, рак

мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарциному, разновидности колоректального рака, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак головы и шеи, рак желудка, интраэпителиальное новообразование, рак почек, рак гортани, рак печени, рак легких (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланому, нейробластому; рак полости рта (например, губы, языка, ротовой полости и глотки), рак яичников, рак поджелудочной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак прямой кишки; рак респираторной системы, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевой системы). Конкретные виды рака включают CD40-экспрессирующие опухоли, выбранные из группы, состоящей из хронического лимфобластного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, первичной лимфомы центральной нервной системы, лимфомы Беркитта и В-клеточной лимфомы из клеток краевой зоны.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения способы можно применять для лечения или предотвращения бактериальной, грибковой, вирусной или паразитарной инфекции.

CD40-экспрессирующие клетки включают любые и все клетки, экспрессирующие CD40, включая, но не ограничиваясь указанными, антигенпрезентирующие клетки (АПК), включая дендритные клетки (ДК), В-клетки, макрофаги и моноциты. CD40 также экспрессируется на других типах клеток, таких как эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и тромбоциты. Экспрессия CD40 была продемонстрирована на различных опухолевых клетках, включая В-клеточную лимфому и клетки рака почек. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения CD40-экспрессирующие клетки включают клеточные линии, такие как клетки линии Jurkat, клетки линии Raji, клетки линии Ramos и клетки линии Daudi. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CD40-экспрессирующие клетки представляют собой опухолевые клетки или раковые клетки. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения CD40-экспрессирующие клетки включают В-клетки, NK-клетки, Т-клетки, которые, как обнаружено, являются инфильтрирующими опухолевыми или раковыми клетками, также называемыми опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами.

Согласно другому варианту реализации настоящее изобретение относится к применению антитела, композиции или биспецифической молекулы, описанных в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для индукции или усиления иммунного ответа против антигена (например, опухолевого антигена) у субъекта. Согласно другим вариантам реализации настоящее изобретение относится к применению антитела или композиции, описанных в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для (1) увеличения иммунного ответа на антиген, (2) ингибирования размножения CD40-экспрессирующих клеток, и/или (3) нацеливания антигена на АПК.

Настоящее изобретение также относится к способам детектирования присутствия или отсутствия CD40 в биологическом образце путем (1) приведения биологического образца в контакт с антителом, описанным в настоящем документе (причем антитело помечено детектируемым веществом) и (2) детектирования антитела, связанного с CD40.

Настоящее изобретение также относится к наборам, содержащим композиции (например, антитела и/или биспецифические молекулы) согласно настоящему изобретению, и необязательно инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, такой как цитокин или комплемент, или одно или более дополнительных антител согласно настоящему изобретению.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены значения равновесной константы диссоциации (K_D), кинетической константы скорости ассоциации (k_{on}) и константы скорости диссоциации (k_{off}) для антител 3С3, 3G5, 1В4, 3В6 и 6Н6, определенные методом интерферометрии биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK[®] (Pall ForteBio, Менло Парк, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

На фиг. 2 приведен график, на котором представлены результаты исследования концентрационной зависимости связывания антител к CD40 человека (включая 3С3, 3G5, 1В4, 3В6 и 6Н6) с планшетными для микротитрования, покрытыми очищенным рекомбинантным CD40 человека, которое оценивали на основании поглощения (OD_{450}) методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

На фиг. 3 приведены графики, на которых представлены результаты исследования концентрационной зависимости связывания антител к CD40 человека (3С3, 3G5, 1В4, 3В6 и 6Н6) с очищенными МКПК человека (слева) и МКПК яванских макаков (справа), представленные как значения средней интенсивности флуоресценции (MFI), измеренные методом проточной цитометрии.

На фиг. 4А и 4В приведены графики, на которых представлены результаты исследования влияния антител к CD40 человека на связывание растворимого лиганда CD40 (sCD40L) с белком CD40, измеренное методом ИФА.

На фиг. 5 представлены результаты исследования связывания антител к CD40 человека (3С3, 3G5, 1В4, 3В6 и 6Н6) с CD40 на клетках линии Raji, экспрессирующих CD40 человека на своей поверхности, измеренного методом проточной цитометрии.

На фиг. 6 представлены результаты исследования связывания антител к CD40 человека (3C3, 3G5, 1B4, 3B6 и 6H6) с CD40 на клетках линии Ramos, экспрессирующих CD40 человека на своей поверхности, измеренного методом проточной цитометрии.

На фиг. 7А и 7В приведены графики, на которых представлены результаты исследования индукции CD95 на клетках линии Ramos под действием антител к CD40 человека.

На фиг. 8А и 8В приведены графики, на которых представлены результаты исследования активации дендритных клеток (ДК) под действием антител к CD40 человека (3C3 и 3G5) на основании изменения уровня экспрессии следующих маркеров: CD54, HLA-DR, CD86, CD83 и процента CD83⁺ клеток, как указано на графиках.

На фиг. 9А и 9В приведены графики, на которых представлены результаты исследования индукции ИЛ-12p40 под действием антител к CD40 человека (3C3 и 3G5).

На фиг. 10А и 10В приведены графики, на которых представлены результаты исследования активации В-клеток под действием антител к CD40 человека (3C3 и 3G5) на основании изменения уровня экспрессии следующих маркеров: CD54, HLA-DR, CD23, процента CD23⁺ клеток, CD69, CD86, CD38 и CD71, как указано на графиках.

На фиг. 11А и 11В приведены графики, на которых представлены результаты исследования активации NFκB под действием антител к CD40 человека с использованием экспрессирующей CD40 клеточной линии, несущей репортер люциферазу.

На фиг. 12 приведены графики, на которых представлены результаты исследования роста опухоли и выживаемости в мышинной опухолевой модели SCID (клетки линии Raji) после лечения с применением клонов антитела к CD40 человека, 3C3 и 3G5, путем внутрибрюшинного введения по 0,3 мг/дозу.

На фиг. 13 приведены графики, на которых представлены результаты исследования роста опухоли и выживаемости в мышинной опухолевой модели SCID (клетки линии Ramos) после лечения с применением клонов антител к CD40 человека, 3C3 и 3G5, путем внутрибрюшинного введения по 0,3 мг/дозу.

На фиг. 14А и 14В приведены графики, на которых представлены результаты исследования пролиферации Т-клеток для меченных МКПК, инкубированных с антителами к CD40, как указано, или антителом для контроля изотипа (IgG2).

На фиг. 15 приведен график, на котором представлены результаты исследования связывания с CD40, независимо от взаимодействия с рецептором Fc, с применением антител к CD40, 3C3 и 3G5.

На фиг. 16 приведен график, на котором представлены результаты исследования активации NFκB с применением антител к CD40, 3C3 и 3G5.

На фиг. 17 приведен график, на котором представлены результаты исследования индукции CD95 на клетках линии Ramos с применением антител к CD40, 3C3 и 3G5.

На фиг. 18 представлено схематическое изображение примерной нацеленной на АПК вакцинной конструкции, содержащей гибридный антител к CD40/антигена.

На фиг. 19 приведен график, на котором представлены результаты исследования синергического действия антитела к CD40, 3C3, в комбинации с растворимым CD40L на экспрессию CD95 в клетках линии Ramos.

На фиг. 20 представлена схема кДНК растворимого CD40, кодирующей полноразмерный внеклеточный домен (ВКД), охватывающий остатки аминокислот 1-173 с N-концевой легкой капшой-цепью и C-концевой меткой Flag.

На фиг. 21 представлены результаты выравнивания аминокислотной последовательности ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133) с аминокислотной последовательностью ВКД CD40 обезьяны (SEQ ID NO: 139) (верхняя панель) и с аминокислотной последовательностью ВКД CD40 мыши (нижняя панель). Полученные фрагменты указаны (нуклеотиды 1-94 в SEQ ID NO: 133, SEQ ID NOS: 140-147).

На фиг. 22 приведены графики, на которых представлены результаты исследования связывания антитела к CD40, 3C3, с фрагментом А ВКД CD40 человека (остатки аминокислот 1-5, верхняя панель) или фрагментом D (остатки аминокислот 33-36, нижняя панель), содержащими различные точечные мутации или их комбинации.

На фиг. 23А-23С приведены графики, на которых представлены результаты исследования уровней аспаратаминотрансферазы (АСТ; 23А), аланинаминотрансферазы (АЛТ; 23В) и креатининкиназы (23С), измеренных у обезьян до и после лечения антителами к CD40, 3C3 или 3G5, в указанные моменты времени.

На фиг. 24 приведен график, на котором представлены результаты исследования уровней ИЛ-12 (пг/мл), измеренных в крови у обезьян, получавших антитела к CD40, 3C3 или 3G5, в указанные моменты времени.

На фиг. 25А-25С приведены графики, на которых представлены результаты подсчета количества лейкоцитов (25А), нейтрофилов (25В) и лимфоцитов (25С) у обезьян до и после лечения антителами к CD40, 3C3 или 3G5, в указанные моменты времени.

На фиг. 26 приведен график, на котором представлены результаты оценки изменения в процентах, относительно начального уровня, количества В-клеток у обезьян, получавших антитела к CD40, 3C3 или 3G5, в зависимости от времени (дни).

На фиг. 27 приведены графики, на которых представлены результаты оценки экспрессии HLA-DR на В-клетках, относительно начального уровня, после введения 2 мг (слева) или 0,2 мг (справа) антитела к CD40 3С3 (квадрат), 3G5 (ромбы) или солевого раствора (круги).

На фиг. 28 приведен график, на котором представлены результаты исследования пролиферации В-клеток, при культивировании клеток в присутствии МАТ к CD40, 3С3.

На фиг. 29 и 30 приведены графики, на которых представлены результаты исследования синергетического действия комбинации МАТ к CD40, 3С3, и CD40L в В-клетках.

На фиг. 31 представлена таблица, в которой приведены ответы цитокинов в цельной крови при инкубации с МАТ к CD40, 3С3.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам к CD40, которые проявляют специфические функциональные свойства, коррелирующие со значительными терапевтическими преимуществами, связанными с активацией иммунной функции (например, опосредуемого Т-клетками иммунного ответа как при различных видах вакцинации терапии, активацией NK-клеток при различных видах терапии рака), ингибированием размножения клеток (например, при терапии рака) и/или усиленным процессингом и презентацией антигена АПК (например, при вакцинации терапии). Такие функциональные признаки включают, например, повышенный иммунный ответ на антиген, не зависящий от связывания с рецептором Fc и/или без индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ). Дополнительные функциональные признаки включают, например, (1) ингибирование (например, полное или частичное блокирование) связывания CD40L (CD154) с CD40-экспрессирующими клетками по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 70%; (2) блокирование связывания CD40L с CD40 человека, не зависящее от связывания с рецептором Fc; (3) индукцию клеточного апоптоза (например, измеренного на основании увеличения экспрессии CD95); (4) повышение активности, направленной на стимуляцию Т-клеток (например, измеренной на основании увеличения экспрессии ИЛ-12p40); и/или (5) увеличение активации В-клеток (например, измеренной на основании увеличения экспрессии по меньшей мере одного маркера клеточной поверхности, выбранного из группы, состоящей из HLA-DR V450, CD54-ФЭ, CD86-АФЦ и CD83 BV510, CD19 V500, CD54-ФЭ, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69-АФЦ, CD86-АФЦ, CD38 PerCP-Cy5.5 и CD71-ФЭ).

Для лучшего понимания настоящего изобретения в первую очередь приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения изложены в тексте подробного описания.

Термин "CD40" (также называемый "молекула CD40", "Bp50", "CDW40", "TNFRSF5", "p50", "В-клеточный поверхностный антиген CD40", "ассоциированная с В-клетками молекула", "антиген CD40", "член суперсемейства рецепторов ФНО 5", "изоформа CD40 типа II", "рецептор CD40L", "молекула активации В-лимфоцитов, родственная рецептору фактора роста нервов" или "член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 5") относится к рецептору, который является членом суперсемейства рецепторов ФНО, который связывается с лигандом CD40L (также называемым CD154). CD40 выступает посредником широкого спектра иммунных и воспалительных ответов, включая переключение класса иммуноглобулинов, зависящее от Т-клеток, и выработку В-клеток памяти. Термин "CD40" включает любые варианты или изоформы CD40, которые экспрессируются клетками в естественных условиях (например, CD40 человека, депонированный в GenBank® под номером доступа № P25942). Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению могут перекрестно реагировать с CD40 из видов, отличных от человека. В другом варианте антитела могут быть специфическими в отношении CD40 человека и могут не проявлять перекрестной реактивности с другими видами. CD40 или любые его варианты и изоформы могут быть выделены из клеток или тканей, которые экспрессируют их в естественных условиях, или рекомбинантно получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе. Предпочтительно антитела нацелены на CD40 человека (чCD40), который имеет природный характер гликозилирования.

Аминокислотная последовательность CD40 человека, депонированная в GenBank® (номер доступа № P25942), приведена ниже (SEQ ID NO: 1).

```
MVRLPLQCVL  WGCLLTAVHP  EPPTACREKQ  YLINSQCCSL  CQPGQKLVSD
СТЕFTЕТЕСL  РСGЕSEFLDT  WNRETHCHQH  KYCDPNLGLR  VQKGTSETD
TICTCEEGWH  CTSEACESCV  LHRSCSPGFG  VKQIATGVSD  TICPCPVGF
FSNVSSAFEK  CHPWTSCETK  DLVVQQAGTN  KTDVVCGPQD  RLRALVVIPI
IFGILFAILL  VLVFIKKVAK  KPTNKARHPK  QEPQEINFPD  DLPGSNTAAP
VQETLHGCPQ  VTQEDGKESR  ISVQERQ
```

Термин "CD40L" (также называемый "CD40-лиганд", "CD407L" или "CD154") относится к лиганду для CD40 (см., например, Schönbeck and Libby (2001) Cell Mol Life Sci, 58(1):4-43). CD40L экспрессируется главным образом на активированных Т-клетках и является членом суперсемейства молекул ФНО. Он связывается с CD40 на антигенпрезентирующих клетках (АПК), что приводит к возникновению множества эффектов в зависимости от типа клеток-мишеней (Parham, Peter (2004). The Immune System

(2nd ed.). Garland Science. Pp. 169-173).

Аминокислотная последовательность CD40L человека, депонированная в GenBank® (номер доступа № NP_000065), приведена ниже (SEQ ID NO: 2):

```

MIETYNQTSP  RSAATGLPIS  MKIFMYLLTV  FLITQMIGSA  LFAVYLHRRRL
DKIEDERNLH  EDFVFMKTIQ  RCNTGERSLS  LLNCEEIKSQ  FEGFVKDIML
NKEETKKENS  FEMQKGDQNP  QIAAHVISEA  SSKTTSVLQW  AEKGYYTMSN
NLVTLENGKQ  LTVKRQGLYY  IYAQVTFCSN  REASSQAPFI  ASLCLKSPGR
FERILLRAAN  THSSAKPCGQ  QSIHLGGVFE  LQPGASVFN  VTDPSQVSHG
TGFTSFGLLK

```

В настоящем документе термин "антитело" включает целые антитела и любой их антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающую часть") или отдельную цепь. "Антитело" относится, согласно одному предпочтительному варианту, к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела") относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, CD40 человека). Такие "фрагменты" содержат, например, от приблизительно 8 до приблизительно 1500 аминокислот в длину, приемлемо от приблизительно 8 до приблизительно 745 аминокислот в длину, приемлемо от приблизительно 8 до приблизительно 300 аминокислот в длину, например, от приблизительно 8 до приблизительно 200 аминокислот в длину или от приблизительно 10 до приблизительно 50 или 100 аминокислот в длину. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть выполнена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , доменов CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенный гипервариабельный участок (CDR); или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, используя рекомбинантные способы, с помощью синтетического линкера, который позволяет им формировать одну белковую цепь, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv), см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу для определения их полезности тем же способом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

"Биспецифическое" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две разные пары тяжелой/легкой цепей и два разных сайта связывания. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

В настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственный вид специфичности связывания и аффинности в отношении конкретного эпитопа. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителу, которое проявляет единственный вид специфичности связывания и которое содержит вариабельные и необязательные кон-

стантные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения моноклональные антитела человека получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

В настоящем документе термин "рекомбинантное антитело человека" включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (а) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулинов человека, или из гибридомы, полученной из такого животного, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, в которых используются конкретные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают следующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в данной области техники (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфичного в отношении чужеродного антигена. В дополнение к перегруппировке переменная область может быть дополнительно модифицирована несколькими изменениями отдельной аминокислоты (называемыми соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела в отношении чужеродного антигена. Константная область изменится при последующем ответе на антиген (т.е., произойдет переключение изотипа). Следовательно, перегруппированные и содержащие соматические мутации последовательности молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не быть идентичны последовательностям исходных молекул нуклеиновых кислот, но, в качестве альтернативы, будут, по существу идентичны или сходны с ними (т.е. имеют по меньшей мере 80% идентичность).

Термин "антитело человека" включает антитела, содержащие переменные и константные области (если они присутствуют) из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфичного мутагенеза в условиях *in vitro* или путем соматической мутации в условиях *in vivo*) (см. Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474):856-859); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13:65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Однако термин "антитело человека" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на последовательности каркаса человека (т.е. гуманизированные антитела).

В настоящем документе термин "гетерологичное антитело" определяется по отношению к трансгенному организму, отличному от человека, вырабатывающему такое антитело. Этот термин относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую той, которая обнаружена в организме, не являющимся трансгенным животным, отличным от человека, и обычно относится к антителу из вида, отличного от вида трансгенного животного, не являющегося человеком.

В настоящем документе термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, которое, по существу не содержит других антител, имеющих разные виды антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD40 человека, по существу, не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD40 человека). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими белками CD40 из разных видов. Тем не менее, антитело предпочтительно всегда связывается с CD40 человека. Помимо этого выделенное антитело, как правило, по существу, не содержит других клеточных материалов и/или химических веществ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения комбинация "выделенных" антител, имеющих разные виды специфичности в отношении CD40, объединена в хорошо установленной композиции.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, сближенных при сворачивании белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворов, тогда как эпитопы, образованные при сворачивании белка в третичную структуру, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содер-

жит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом (т.е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области техники и включают, например, количественные исследования с помощью иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды из CD40 испытывают для определения их способности реагировать с данным антителом к CD40. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные в данной области техники и описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Соответственно, антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом, или эпитопом на CD40, который содержит весь или часть эпитопа, распознаваемого конкретными антителами, описанными в настоящем документе (например, одну и ту же или перекрывающуюся область или область, которая находится в пределах или охватывает область эпитопа), также предусмотрены согласно настоящему изобретению. Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом или эпитопом, который содержит весь или часть эпитопа, распознаваемого конкретным антителом, могут быть идентифицированы с использованием стандартных методик. Такие методики включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеновские исследования кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. Другие способы позволяют контролировать связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, при этом потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто рассматривается как указание на эпитопный компонент. Помимо этого для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные способы. Эти способы основаны на способности антитела, представляющего интерес, обеспечивать аффинное выделение специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Пептиды затем рассматривают как средство для установления эпитопа, соответствующего антителу, использованному для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, картируют конформационные прерывистые эпитопы.

Настоящее изобретение также относится к антителам, которые конкурируют за связывание с CD40 человека с антителами, описанными в настоящем документе. Антитела, которые конкурируют за связывание, могут быть идентифицированы с использованием стандартных методик. Подходящие методики включают, например, иммунологические количественные исследования, которые показывают способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т.е. количественное исследование конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в количественном исследовании, в котором испытываемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как CD40. Известны многочисленные типы количественных исследований конкурентного связывания, например: прямой или непрямой твердофазный радиоиммуноанализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), количественное исследование конкурентного связывания в формате "сэндвич" (см. Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); прямой твердофазный EIA на основе биотина-авидина (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); прямой твердофазный количественный способ исследований с использованием метки, прямой твердофазный количественный способ исследований с использованием метки в формате "сэндвич" (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); прямой твердофазный RIA с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный EIA на основе биотина-авидина (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и прямой RIA с использованием метки (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Как правило, такое количественное исследование включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из немеченого испытываемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии испытываемого иммуноглобулина. Обычно испытываемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более.

В настоящем документе термин "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфически связывается" относится к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, антитело связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно менее 10^{-7} М, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, определенной методом интерферометрии биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK^c или технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE 2000 с использованием рекомбинантного CD40 человека в качестве анализа и антитела в качестве лиганда, и связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, чем аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от заранее определенного антигена или близкородственного антигена. В настоящем

документе выражения "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное в отношении антигена" используются взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

В объем настоящего изобретения также включены антитела, которые связываются с CD40 человека и способны увеличивать иммунный ответ, независимо от связывания с рецептором Fc. Например, такие антитела проявляют сильные агонистические признаки без перекрестного сшивания с рецептором Fc, таким как FcγR. Такие агонистические признаки включают, например, увеличение активности Т-клеток и/или увеличение активации В-клеток, согласно результатам измерения, например, на основании увеличения экспрессии маркеров клеточной поверхности.

В настоящем документе термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитела человека согласно настоящему изобретению связываются с CD40 с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 10^{-8} М или менее, например, менее 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М или даже ниже, определенной методом интерферометрии биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK^c или методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE 2000 с использованием рекомбинантного CD40 человека в качестве аналита и антитела в качестве лиганда.

В настоящем документе термин "kd" предназначен для обозначения константы скорости обратной реакции для диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

В настоящем документе термин "ka" предназначен для обозначения константы скорости прямой реакции для ассоциации антитела с антигеном.

В настоящем документе термин " $ЭК_{50}$ " относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, который составляет 50% от максимального ответа, т.е. величина ответа находится на середине кривой с конечными точками, соответствующими максимальному ответу и ответу в начальных условиях.

В настоящем документе термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgG1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgG2.

Термин "связывается с иммобилизованным CD40" относится к способности антитела человека согласно настоящему изобретению связываться с CD40, например, экспрессируемым на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

В настоящем документе термин "перекрестно реагирует" относится к способности антитела согласно настоящему изобретению связываться с CD40 из разных видов. Например, антитело согласно настоящему изобретению, которое связывается с CD40 человека, также может связываться с CD40 из другого вида. В настоящем документе перекрестную реактивность измеряют путем детектирования специфической реакционной способности в отношении очищенного антигена в количественных исследованиях связывания (например, SPR, ИФА) или связывания или иного функционального взаимодействия с клетками, экспрессирующими CD40. Способы определения перекрестной реакционной способности включают стандартные количественные исследования связывания, описанные в настоящем документе, например, интерферометрию биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK^c или поверхностный плазмонный резонанс (SPR) с использованием прибора Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция) или методики проточной цитометрии.

В настоящем документе термин "переключение изотипа" относится к явлению, при котором класс или изотип антитела изменяется с одного класса Ig на один из других классов Ig.

В настоящем документе термин "непереключенный изотип" относится к изотипическому классу тяжелой цепи, которая вырабатывается в отсутствие переключения изотипа; ген CH, кодирующий непереключенный изотип, как правило, является первым геном CH, расположенным непосредственно после функционально перестроенного гена VDJ. Переключение изотипов классифицируют как классическое или неклассическое переключение изотипов. Классическое переключение изотипов происходит посредством событий рекомбинации, которые вовлекают по меньшей мере один участок последовательности переключения в трансгене. Неклассическое переключение изотипов может происходить, например, путем гомологичной рекомбинации между $\sigma\mu$ человека и $\Sigma\mu$ человека (σ -связанная делеция). Альтернативные неклассические механизмы переключения, такие как интертрансгенная и/или межхромосомная рекомбинация, помимо прочих, также могут происходить и приводить к переключению изотипа.

В настоящем документе термин "последовательность переключения" относится к тем последовательностям ДНК, которые отвечают за рекомбинацию на этапе переключения. Последовательность "донора переключения", как правило, μ -участок переключения, будет расположена в направлении 5'-конца (т.е. перед) относительно участка конструкции, подлежащего удалению во время рекомбинации на этапе переключения. Участок "акцептора переключения" будет находиться между участком конструкции, подлежащим удалению, и константной областью замещения (например, у, s и т.д.). Поскольку не существует

конкретного сайта, в котором всегда происходит рекомбинация, конечная последовательность генов, как правило, не может быть предсказана на основании конструкции.

В настоящем документе термин "профиль гликозилирования" определяется как профиль углеводных блоков, которые ковалентно присоединены к белку, более конкретно к белку иммуноглобулина. Профиль гликозилирования гетерологичного антитела можно охарактеризовать как, по существу, аналогичный профилям гликозилирования, которые имеют место в естественных условиях на антителах, вырабатываемых видом трансгенного животного, отличного от человека, в том случае, когда специалист в данной области техники установит, что профиль гликозилирования гетерологичного антитела является более сходным с указанным профилем гликозилирования у вида трансгенного животного, отличного от человека, чем у вида, от которого были получены гены СН трансгена.

В настоящем документе термин "природный", применительно к объекту, относится к тому факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лабораторных условиях, является природной.

В настоящем документе термин "перегруппированный" относится к конфигурации локуса тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, где V-сегмент расположен непосредственно рядом с D-J или J-сегментом в конформации, кодирующей, по существу, полноразмерный домен V_H или V_L, соответственно. Перегруппированный локус гена иммуноглобулина можно идентифицировать путем сравнения с ДНК зародышевой линии; перегруппированный локус будет содержать по меньшей мере один рекомбинированный гомологический элемент гептамера/нонамера.

В настоящем документе термин "неперегруппированный" или "конфигурация зародышевой линии" в отношении V-сегмента относится к конфигурации, в которой V-сегмент не рекомбинирован так, чтобы примыкать непосредственно к сегменту D или J.

В настоящем документе термин "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

В настоящем документе термин "выделенная молекула нуклеиновой кислоты", используемый в отношении нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или части антитела (например, V_H, V_L, CDR3), которые связываются с CD40, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, в которой нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или часть антитела, не содержат других нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела или части антител, которые связывают антигены, отличные от CD40, при этом указанные другие последовательности могут фланкировать нуклеиновую кислоту в геномной ДНК человека.

В объем настоящего изобретения также включены "консервативные модификации последовательности" последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 3-132, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, которые не устраняют связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные замены нуклеотидов и аминокислот, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3-148, с помощью стандартных методов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез. Консервативные замены аминокислот включают те, в которых остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, предсказанный остаток заменимой аминокислоты в антителе к CD40 человека предпочтительно заменен другим остатком аминокислоты из этого же семейства боковых цепей. Способы выявления консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Консервативные замены могут быть сделаны, например, в соответствии с приведенной ниже таблицей. Например, аминокислоты в одном и том же блоке во второй колонке и предпочтительно в одной и той же строке в третьем столбце могут заменять друг друга.

Алифатические	Неполярные	GAP
---------------	------------	-----

		ILV
	Полярные незаряженные	CSTM
		NQ
	Полярные заряженные	DE
KR		
Ароматические		HFWY

Альтернативно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, мутации могут быть введены случайным образом по всей длине или в части кодирующей последовательности антитела к CD40, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела к CD40 могут быть подвергнуты скринингу для оценки активности связывания.

В случае нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты, или их специально выделенные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении, являются идентичными, с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов, в отношении по меньшей мере приблизительно 80% нуклеотидов, обычно в отношении по меньшей мере от приблизительно 90 до 95% нуклеотидов и более предпочтительно в отношении по меньшей мере от приблизительно 98 до 99,5% нуклеотидов. В другом варианте значительная гомология существует, если сегменты будут гибридизоваться в селективных условиях гибридизации с комплементарным партнером цепи.

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, присутствующих в последовательностях (т.е. % гомологии=количество идентичных положений/общее количество положений×100), с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, описанного в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием программы GAP в программном пакете GCG (доступен по веб-адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP, штрафа за введение пробела 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за продолжение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был встроен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение пробела 12 и штрафа за введение пробела 4. Помимо этого процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который был встроен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по веб-адресу <http://www.gcg.com>), используя матрицу Blossum 62 или матрицу PAM250, и штраф за введение пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за увеличение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и белков согласно настоящему изобретению можно далее использовать в качестве "последовательности для запроса" для выполнения поиска по общедоступным базам данных, например, для выявления родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов в BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Поиск белка в BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белка согласно настоящему изобретению. Чтобы получить выравнивания с пробелами для целей сравнения можно применять Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или, по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота "выделена" или "превращена в, по существу чистую" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнений, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочами/ДСН, разделение в градиенте CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Композиции нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, несмотря на то, что они часто представлены в виде нативной последовательности (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и т.п.), из кДНК, геномной ДНК или их смесей могут быть мутированы в соответствии со стан-

дартными методиками, чтобы обеспечить последовательности генов. В случае кодирующих последовательностей такие мутации могут влиять на аминокислотную последовательность, если необходимо. В частности, в объем настоящего изобретения включены последовательности ДНК, по существу, гомологичные или происходящие из нативных V-, D-, J-, константных последовательностей, переключателей и других таких последовательностей, описанных в настоящем документе (где "происходящие" указывает на то, что последовательность идентична другой последовательности или получена путем ее модификации).

Нуклеиновая кислота "функционально соединена", если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально соединен с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. В отношении регулирующих транскрипцию последовательностей функционально соединенный означает, что соединенные последовательности ДНК являются смежными и, если необходимо соединить две кодирующие белок области, смежными и находящимися в одной рамке считывания. В случае последовательностей переключения функциональное соединение указывает на то, что последовательности способны осуществлять рекомбинацию на этапе переключения.

В настоящем документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к циклической петле двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. В настоящем документе такие векторы называются "рекомбинантные векторы экспрессии" (или просто "векторы экспрессии"). Обычно векторы экспрессии, подходящие для применения в способах рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако, подразумевается, что в объем настоящего изобретения включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

В настоящем документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут произойти в последующих поколениях вследствие мутаций, так и воздействий окружающей среды, такое потомство не может, фактически, быть идентичным родительской клетке, тем не менее, оно все еще включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем документе.

В настоящем документе термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антигены, подходящие для применения в настоящем изобретении (например, в вакцине в комбинации с антителом к CD40 согласно настоящему изобретению), включают, например, антигены инфекционных заболеваний и опухолевые антигены, против которых желательны защитные или терапевтические иммунные ответы, например, антигены, экспрессируемые опухолевой клеткой или патогенным организмом, или антигены инфекционных заболеваний. Например, подходящие антигены включают ассоциированные с опухолью антигены для предотвращения или лечения рака. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают, но не ограничиваются указанными, последовательности, содержащие полные последовательности или их части антигенов β hCG, gp100 или Pmel17, HER2/neu, WT1, мезотелина, CEA, gp100, MART1, TRP-2, мелана-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотипа, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, тирозиназы, теломеразы, SSSX2 и MUC-1, а также опухолевых антигенов, происходящих из зародышевых клеток. Ассоциированные с опухолью антигены также включают антигены группы крови, например, антигены Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. В другом варианте более чем один антиген может быть включен в конструкции антиген-антитело согласно настоящему изобретению. Например, антиген MAGE может быть комбинирован с другими антигенами, такими как меланин А, тирозиназа и gp100, наряду с адьювантами, такими как ГМ-КСФ или ИЛ-12, и соединен с антителом к АПК.

Другие подходящие антигены включают вирусные антигены для предотвращения или лечения вирусных заболеваний. Примеры вирусных антигенов включают, но не ограничиваются указанными, антигены gag ВИЧ-1, env ВИЧ-1, nef ВИЧ-1, ВГВ (поверхностные или коровые антигены), ВПЧ, FAS, ВПП-1, ВПП-2, p17, ORF2 и ORF3. Примеры бактериальных антигенов включают, но не ограничиваются указанными, *Toxoplasma gondii* или *Treponema pallidum*. Конъюгаты антитело-бактериальный антиген согласно

настоящему изобретению можно применять при лечении или предотвращении различных бактериальных заболеваний, таких как сибирская язва, ботулизм, столбняк, хламидиоз, холера, дифтерия, болезнь Лайма, сифилис и туберкулез. Другие подходящие антигены из патогенов, вызывающих инфекционные заболевания, таких как вирусы, бактерии, паразиты и грибки, описаны ниже.

Последовательности вышеуказанных антигенов хорошо известны в данной области техники. Например, пример последовательности кДНК *MAGE-3* представлен в патенте США № 6235525 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности *NY-ESO-1* представлены в патентах США № 5804381 и 6069233 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности мелана-А приведены в патентах США № 5620886 и 5854203 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности *NY-BR-1* приведены в патентах США № 6774226 и 6911529 (Институт исследований рака Людвиг), и примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности *NY-CO-58* приведены в WO 02090986 (Институт исследований рака Людвиг); пример аминокислотной последовательности белка *HER-2/neu* доступен в GenBank® под номером доступа AAA58637; и нуклеотидная последовательность (мРНК) для сходного с карциноэмбриональным антигеном белка 1 (*CEA-1*) человека доступна в GenBank® под номером доступа NM_020219.

Антиген ВПЧ, который можно применять в композициях и способах согласно настоящему изобретению, может включать, например, антиген ВПЧ-16, антиген ВПЧ-18, антиген ВПЧ-31, антиген ВПЧ-33 и/или антиген ВПЧ-35; также допустим антиген ВПЧ-16 и/или антиген ВПЧ-18. Геном ВПЧ-16 описан в *Virology*, 145:181-185 (1985), и последовательности ДНК, кодирующие ВПЧ-18, описаны в патенте США № 5840306, раскрытие которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Антигены ВПЧ-16 (например, серореактивные области белков E1 и/или E2 ВПЧ-16) описаны в патенте США № 6531127, и антигены ВПЧ-18 (например, серореактивные области белков L1 и/или L2 ВПЧ-18) описаны в патенте США № 5840306, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аналогичным образом, полный геном ВГВ доступен в GenBank® под номером доступа NC_003977, раскрытие которого включено в настоящий документ. Геном ВГС описан в Европейской заявке на патент № 318216, раскрытие которой включено в настоящий документ. В PCT/US90/01348, включенном в настоящий документ посредством ссылки, раскрыта информация о последовательности клонов генома ВГС, аминокислотных последовательностях вирусных белков ВГС и способах получения и применения таких композиций для вакцин против ВГС, содержащих белки ВГС и пептиды, полученные из них.

Антигенные пептиды белков (т.е. те, которые содержат Т-клеточные эпитопы) могут быть выявлены различными способами, хорошо известными в данной области техники. Например, Т-клеточные эпитопы могут быть предсказаны путем анализа последовательности белка с использованием прогностических алгоритмов (*BIMAS & SYFPEITHI*), доступных в Интернете, чтобы получить потенциальные пептиды, связывающиеся с ГКГС класса I и II, которые соответствуют внутренней базе данных 10000 хорошо охарактеризованных ГКГС-связывающих пептидов, определенных ранее с помощью ЦТЛ. Пептиды с высокими оценками могут быть отнесены к определенной категории и отобраны как "интересные" на основании высокой аффинности в отношении данной молекулы ГКГС.

Другой способ выявления антигенных пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, заключается в делении белка на неперекрывающиеся пептиды желаемой длины или перекрывающиеся пептиды желаемой длины, которые могут быть получены рекомбинантными, синтетическими способами или, в определенных ограниченных ситуациях, путем химического расщепления белка, и испытания иммуногенных свойств, например, способности вызывать ответы Т-клеток (т.е. пролиферацию или секрецию лимфокинов).

Чтобы определить точные Т-клеточные эпитопы белка, например, с помощью методик точного картирования, пептид, обладающий активностью, направленной на стимуляцию Т-клеток, и, следовательно, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, определенный с помощью методик биологии Т-клеток, может быть модифицирован путем добавления или делеции остатков аминокислот как на аминоконце, так и на карбокси-конце пептида, и испытан для определения изменения реактивности Т-клеток в отношении модифицированного пептида. Если обнаружено, что два или более пептидов, которые имеют область перекрытия в нативной белковой последовательности, обладают активностью, направленной на стимуляцию Т-клеток человека, согласно результатам определения с помощью методик биологии Т-клеток, то могут быть получены дополнительные пептиды, содержащие такие полные пептиды или их часть, и указанные дополнительные пептиды могут быть испытаны с помощью аналогичной процедуры. Следуя этой методике, пептиды отбирают и получают рекомбинантно или синтетически. Пептиды отбирают на основании различных факторов, включая интенсивность ответа Т-клеток на пептид (например, индекс стимуляции). Физические и химические свойства таких отобранных пептидов (например, растворимость, стабильность) затем можно исследовать для определения пригодности этих пептидов для применения в терапевтических композициях или необходимости модификации пептидов.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "АПК" обозначает клетку, которая представляет на своей поверхности чужеродный антиген, образующий комплекс с ГКГС. Т-клетки распознают этот комплекс с помощью Т-клеточного рецептора (TCR). Примеры АПК включают, но не ограничиваются ука-

занными, дендритные клетки (ДК), моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), моноциты (такие как THP-1), В-лимфобластные клетки (такие как C1R.A2, 1518 B-LCL) и дендритные клетки моноцитарного происхождения (ДК). Некоторые АПК интернализуют антигены путем фагоцитоза или опосредуемого рецепторами эндоцитоза. Примеры рецепторов АПК включают, но не ограничиваются указанными, лектины С-типа, такие как, рецептор дендритных или эпителиальных клеток человека 205 (DEC-205) и макрофагальный рецептор маннозы человека.

Термин "презентация антигена" относится к процессу, посредством которого АПК захватывают антигены и обеспечивают их распознавание Т-клетками, например, в качестве компонента конъюгата ГКГС-I и/или ГКГС-II.

"Молекулы ГКГС" включают два типа молекул, ГКГС класса I и ГКГС класса II. Молекулы ГКГС класса I представляют антиген специфическим CD8⁺ Т-клеткам, и молекулы ГКГС класса II представляют антиген специфическим CD4⁺ Т-клеткам. Антигены, доставленные к АПК экзогенно, в первую очередь подвергаются процессингу для ассоциации с ГКГС класса II. Напротив, антигены, доставленные к АПК эндогенно, в первую очередь подвергаются процессингу для ассоциации с ГКГС класса I.

В настоящем документе термин "иммуностимулирующий агент" включает, но не ограничивается указанными, соединения, способные стимулировать АПК, такие как ДК и макрофаги. Например, подходящие иммуностимулирующие агенты для применения в настоящем изобретении способны стимулировать АПК так, что процесс созревания АПК ускоряется, увеличивается пролиферация АПК и/или усиливается привлечение или высвобождение костимулирующих молекул (например, CD80, CD86, ICAM-1, молекул ГКГС и CCR7) и провоспалительных цитокинов (например, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-15 и ИФН-γ). Подходящие иммуностимулирующие агенты также способны увеличивать пролиферацию Т-клеток. Такие иммуностимулирующие агенты включают, но не ограничиваются указанными, лиганд CD27; лиганд FLT 3; цитокины, такие как ИФН-α, ИФН-β, ИФН-γ и ИЛ-2; колониестимулирующие факторы, такие как Г-КСФ (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) и ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор); антитело к CTLA-4, антитело к PD1, антитело к 41BB или антитело к OX-40; ЛПС (эндотоксин); оцРНК; дцРНК; бациллу Кальмета-Герена (БЦЖ); гидрохлорид левамизола; и внутривенные иммунные глобулины. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения иммуностимулирующий агент может представлять собой агонист Toll-подобного рецептора (TLR). Например, иммуностимулирующий агент может представлять собой агонист TLR3, такой как двухцепочечный полинуклеотид инозин:цитозин (поли-I:C, например, доступный как амплиген (Ampligen™) от Hemisphere Biopharma, Пенсильвания, США, или поли-IC:LC, доступный от Oncovir) или поли-A:U; агонист TLR4, такой как монофосфориллипид А (MPL) или RC-529 (например, доступный от GSK, Великобритания); агонист TLR5, такой как флагеллин; агонист TLR7 или TLR8, такой как имидазохинолин, агонист TLR7 или TLR8, например, имиквимод (например, алдара (Aldara™)) или резиквимод и родственные имидазохинолиновые агенты (например, доступные от 3M Corporation); или агонист TLR 9, такой как дезоксиинуклеотид с метилированными мотивами CpG (так называемые "CpGs", например, доступные от Coley Pharmaceutical). Предпочтительным иммуностимулирующим агентом является агонист TLR3, предпочтительно поли-I:C. Такие иммуностимулирующие агенты могут быть введены одновременно, по отдельности или последовательно с антителами и конструкциями согласно настоящему изобретению, а также могут быть физически соединены с антителами и конструкциями.

В настоящем документе термин "соединенный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. рекомбинантно гибридной). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра общепринятых в данной области техник методик, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантного белка.

В настоящем документе термин "перекрестная презентация" антигена относится к презентации экзогенных белковых антигенов Т-клеткам посредством молекул ГКГС класса I и класса II на АПК.

В настоящем документе термин "опосредуемый Т-клетками ответ" относится к любому ответу, опосредуемому Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки (например, CD8 клетки) и хелперные Т-клетки (например, CD4 клетки). Опосредуемые Т-клетками ответы включают, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

В настоящем документе термин "цитотоксический Т-лимфоцит (ЦТЛ)" относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. Ответы ЦТЛ опосредуются в основном CD8⁺ Т-клетками.

В настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания CD40L с CD40 на клетках) используются взаимозаменяемо и включают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование CD40L предпочтительно снижает или изменяет нормальный уровень или тип активности, который возникает при связывании CD40L без ингибирования или блокирования. Также подразумевается, что ингибирование и блокирование включают любое измеримое уменьшение аффинности связывания CD40L при контакте с антителом к CD40, по сравнению с CD40L, не вступающим в контакт с антителом к CD40, на-

пример, ингибирование связывания CD40L по меньшей мере на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения антитело к CD40 ингибирует связывание CD40L по меньшей мере на приблизительно 70%, согласно результатам измерения, например, с помощью BLI или SPR (Biacore). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к CD40 ингибирует связывание CD40L на по меньшей мере приблизительно 80%.

В настоящем документе термин "ингибирует размножение" (например, по отношению к клеткам) предназначен для включения любого измеримого уменьшения размножения клетки, например, ингибирования размножения клетки по меньшей мере на приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%.

Термины "индукция иммунного ответа", "увеличение иммунного ответа" и "усиление иммунного ответа" используются взаимозаменяемо и относятся к стимуляции иммунного ответа (т.е., как пассивного, так и адаптивного) на определенный антиген.

Термины "индуцировать" и "увеличивать", используемые в отношении индукции КЗЦ или АЗКЦ, относятся к стимуляции конкретных механизмов непосредственного уничтожения клеток. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело в концентрации 10 мкг/мл индуцирует по меньшей мере приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% лизис CD40-экспрессирующих клеток посредством КЗЦ. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения антитело в концентрации 10 мкг/мл индуцирует по меньшей мере приблизительно 40% лизис CD40-экспрессирующих клеток посредством КЗЦ. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело в концентрации 10 мкг/мл индуцирует по меньшей мере приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 85% лизис CD40-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ (т.е. специфический лизис). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело в концентрации 10 мкг/мл индуцирует по меньшей мере приблизительно 40% лизис CD40-экспрессирующих клеток посредством АЗКЦ.

В настоящем документе термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем документе. В способах "лечения" применяют введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, антитела человека согласно настоящему изобретению, например, субъекту, нуждающемуся в усиленном иммунном ответе против конкретного антигена, или субъекту, у которого в конечном итоге может развиваться такое расстройство, чтобы предотвратить, излечить, задержать, уменьшить степень тяжести или улучшить один или более симптомов расстройства или рецидивирующего расстройства, или для того чтобы продлить период выживания субъекта сверх того, который ожидается при отсутствии такого лечения.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желательного эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного купирования заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего этим заболеванием. Количества, эффективные для такого применения, будут зависеть от степени тяжести расстройства, которое лечат, и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

В настоящем документе термин "синергический" означает, что введение двух лекарственных препаратов оказывает большее влияние при применении в комбинации, чем можно было бы ожидать от суммирования индивидуальных эффектов двух компонентов, например, более чем в два раза, более чем в три раза, более чем в пять раз или более чем в десять раз, чем можно было бы ожидать от суммирования индивидуальных эффектов двух компонентов. Например, взаимодействия лекарственных препаратов можно исследовать с использованием коммерческого программного пакета CalcuSyn, который основан на модели медианного эффекта, описанной Chou и Talalay (Chou, T.C. & Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors). Комбинированный индекс (К.И.) равный 1 указывал на аддитивное взаимодействие лекарственных препаратов, тогда как К.И. больше 1 указывал на антагонистическое взаимодействие, и оценка ниже 1 указывала на синергическое взаимодействие. Определения значений К.И. заключаются в следующем: 1,45-1,2 является умеренно антагонистическим, 1,2-1,1 является незначительно антагонистическим, 1,1-0,9 является аддитивным, 0,9-0,85 является незначительно синергическим, 0,85-0,7 является умеренно синергическим и 0,7-0,3 является синергическим.

Термин "пациент" включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

В настоящем документе термин "субъект" включает любого человека или животное, отличное от человека. Например, способы и композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта с иммунным расстройством. Термин "животное, отличное от человека" включает всех позвоночных животных, например, млекопитающих и животных, отличных от млекопитающих, таких как приматы, отличных от человека, овца, собака, корова, куры, амфибии, рептилии и т.д.

Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в подразделах ниже.

I. Получение антител к CD40.

Антитела к CD40 согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием ряда известных методик, таких как стандартная методика гибридизации соматических клеток, описанная Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Несмотря на то, что могут быть использованы процедуры гибридизации соматических клеток, в целом можно применять и другие способы получения моноклональных антител, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, методику фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека.

В конкретном (примерном) варианте реализации настоящего изобретения мышь (например, трансгенных мышей линии H2L2 Harbour®) или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют подходящим антигеном, чтобы вызывать выработку лимфоцитов, которые вырабатывают или способны вырабатывать антитела, которые будут специфически связываться с антигеном, использованным для иммунизации. В другом варианте лимфоциты могут быть иммунизированы в условиях *in vitro*. Затем лимфоциты могут быть слиты с клетками миеломы с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Культуральную среду, в которой размножаются клетки гибридомы, исследуют для определения выработки моноклональных антител, направленных против антигена. После выявления гибридомных клеток, которые вырабатывают антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы с помощью способа серийных разведений и размножены с помощью стандартных способов (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Культуральные среды, подходящие для этой цели, включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Помимо этого клетки гибридомы можно размножать в условиях *in vivo* как асцитные опухоли у животного. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть отделены от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, очистка на носителе протеин А-сепароза, хроматография на гидроксилпатитном носителе, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела, направленные против CD40, получают с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении применяют трансгенных мышей, называемых в настоящем документе "мыши HuMAb", которые содержат минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неперегрунтованные последовательности тяжелой цепи (μ и γ) и легкой к-цепи иммуноглобулинов, вместе с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и к цепи (Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Соответственно, мыши проявляют сниженную экспрессию мышинового IgM или к, и, в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелой и легкой цепей человека подвергаются переключению класса и соматическому мутированию для получения высокоаффинных моноклональных антител IgGк человека (Lonberg, N. et al. (1994), см. выше; рассмотрено в Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546). Получение мышей HuMAb подробно описано в разделе II ниже и в Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474):856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Также см. патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; все выданы Lonberg and Kay, и GenPharm International; патент США № 5545807, выданный Surani et al.; международную публикацию WO 98/24884, опубликованную 11 июня 1998 г.; WO 94/25585, опубликованную 10 ноября 1994 г.; WO 93/1227, опубликованную 24 июня 1993 г.; WO 92/22645, опубликованную 23 декабря 1992 г.; WO 92/03918, опубликованную 19 марта 1992 г.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела, которые связываются с CD40 человека, могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных с использованием методик, описанных, например, в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) и Hoet et al (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348; патентах США № 5223409; 5403484; и 5571698, выданных Ladner et al.; патентах США № 5427908 и 5580717, выданных Dower et al.; патентах США № 5969108 и 6172197, выданных McCafferty et al; и патентах США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданных Griffiths et al. Помимо этого для получения высокоаффинных (в диапазоне наномолярных концентраций) антител человека также можно применять способ перестановки цепей (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторную инфекцию и рекомбинацию в условиях *in vivo* в качестве стратегии для конструи-

рования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения антитело, которое связывается с CD40 человека, получают с использованием методики фагового дисплея, описанной Hoet et al., см. выше. Эта методика включает создание библиотеки Fab человека, имеющей уникальную комбинацию последовательностей иммуноглобулинов, выделенных у людей-доноров, и имеющей синтетическое разнообразие в CDR тяжелой цепи. Затем библиотеку подвергают скринингу для выявления Fab, которые связываются с CD40 человека.

Предпочтительной системой на животных для создания гибридом, которые вырабатывают антитела согласно настоящему изобретению, является система на мышах. Получение гибридом у мышей хорошо известно в данной области техники, включая протоколы иммунизации и методики выделения и слияния иммунизированных спленоцитов.

Получение трансфектом, вырабатывающих моноклональные антитела к CD40.

Антитела согласно настоящему изобретению также могут быть получены в трансфектоне клетки-хозяина, используя, например, комбинацию методик рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, хорошо известных в данной области техники (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения представляющий интерес ген (гены), например, гены антитела человека, можно лигировать в вектор экспрессии, такой как плазида для экспрессии у эукариот, такая как система экспрессии на основе GS-гена, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841, или другие системы экспрессии, хорошо известные в данной области техники. Очищенную плазмиду с клонированными генами антитела можно вводить в эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки линии CHO или клетки линии NSO или, в другом варианте, другие эукариотические клетки, такие как клетки, полученные из растений, грибковые или дрожжевые клетки. Способ, использованный для введения таких генов, может представлять собой способ, описанный в данной области техники, такой как электропорация, липофектин, липофектамин или другие. После введения таких генов антител в клетки-хозяева могут быть выявлены и отобраны клетки, экспрессирующие антитело. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые затем могут быть подвергнуты амплификации для оценки уровня экспрессии, и их количество может быть увеличено для выработки антител. Рекомбинантные антитела могут быть выделены и очищены из супернатантов указанных культур и/или клеток.

В другом варианте такие клонированные гены антител могут быть экспрессированы в других системах экспрессии, таких как *E. coli*, или в полных организмах, или могут быть синтетически экспрессированы.

Применение частичных последовательностей антител для экспрессии интактных антител.

Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести гипервариабельных участках (CDR) тяжелых и легких цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR более разнообразны в отдельных антителах, чем последовательности вне CDR.

Поскольку последовательности CDR ответственны за большую часть взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических природных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые содержат последовательности CDR из специфического природного антитела, привитые на каркасные последовательности из другого антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321:522-525; и Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК, которые содержат последовательности генов антител зародышевой линии. Такие последовательности зародышевой линии будут отличаться от последовательностей генов зрелых антител, поскольку они не будут содержать полностью собранные вариабельные гены, которые образуются путем V(D)J-соединения во время созревания В-клеток. Последовательности генов из зародышевой линии также будут отличаться от последовательностей высокоаффинных антител вторичного репертуара на индивидуальном уровне и равномерно по всей вариабельной области. Например, соматические мутации относительно редки в аминоконцевой части каркасного участка. Например, соматические мутации относительно редки в аминоконцевой части каркасного участка 1 и в карбокси-концевой части каркасного участка 4. Кроме того, многие соматические мутации не оказывают существенного влияния на связывающие свойства антитела. По этой причине нет необходимости получать всю последовательность ДНК конкретного антитела для воссоздания интактного рекомбинантного антитела, обладающего связывающими свойствами, которые аналогичны свойствам исходного антитела (см. PCT/US99/05535, поданный 12 марта 1999 г.). Для этой цели обычно достаточно частичной последовательности тяжелых и легких цепей, охватывающей участки CDR. Частичную последовательность применяют, чтобы определить какие вариабельные и соединенные сегменты генов зародышевой линии внесли вклад в рекомбинированные вариабельные гены антител. Последовательность зародышевой линии затем применяют для заполнения отсутствующих частей вариабельных областей. Лидерные последовательности тяжелой и легкой цепей отщепляются во время созревания белка и не вносят вклад в свойства готового антитела. Чтобы добавить

отсутствующие последовательности, клонированные последовательности кДНК можно комбинировать с синтетическими олигонуклеотидами путем лигирования или амплификации методом ПЦР. В другом варианте полная переменная область может быть синтезирована как набор коротких, перекрывающихся олигонуклеотидов и комбинирована путем амплификации методом ПЦР, чтобы создать клон полностью синтетической переменной области. Этот процесс имеет определенные преимущества, такие как элиминация или включение конкретных сайтов рестрикции, или оптимизация конкретных кодонов.

Нуклеотидные последовательности транскриптов тяжелой и легкой цепей из гибридомы применяют для конструирования перекрывающегося набора синтетических олигонуклеотидов, чтобы создать синтетические V-последовательности с идентичными способностями кодировать аминокислоты, как и у природных последовательностей. Синтетические последовательности тяжелой цепи и легкой каппа-цепи могут отличаться от природных последовательностей тремя путями: нити повторяющихся нуклеотидных оснований прерываются для облегчения синтеза олигонуклеотидов и амплификации ПЦР; оптимальные сайты инициации трансляции встроены в соответствии с правилами Козак (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); и сайты HindIII конструируют в направлении 5'-конца относительно сайтов инициации трансляции.

В случае переменных областей обеих тяжелой и легкой цепей оптимизированные последовательности кодирующих, и соответствующих некодирующих, цепей разбивают на 30-50 нуклеотидов приблизительно в середине соответствующего некодирующего олигонуклеотида. Следовательно, для каждой цепи, олигонуклеотиды могут быть собраны в перекрывающиеся двухцепочечные наборы, которые охватывают сегменты из 150-400 нуклеотидов. Затем пулы применяют в качестве матриц для получения продуктов ПЦР-амплификации, содержащих 150-400 нуклеотидов. Как правило, отдельный набор олигонуклеотидов переменной области будет разбит на два пула, которые амплифицируют по отдельности для создания двух перекрывающихся продуктов ПЦР. Такие перекрывающиеся продукты затем комбинируют с помощью амплификации методом ПЦР для создания полной переменной области. Также желательным может быть включение перекрывающегося фрагмента константной области тяжелой или легкой цепей (включая сайт BbsI легкой каппа-цепи или сайт AgeI в случае тяжелой гамма-цепи) при амплификации методом ПЦР, чтобы получить фрагменты, которые могут быть легко клонированы в конструкции векторов экспрессии.

Восстановленные переменные области тяжелой и легкой цепей затем комбинируют с клонированным промотором, лидерной последовательностью, сайтом инициации трансляции, лидерной последовательностью, константной областью, 3'-нетранслируемой областью, последовательностью полиаденилирования и сигналом терминации транскрипции, последовательностями для образования конструкций векторов экспрессии. Конструкции для экспрессии тяжелой и легкой цепей могут быть комбинированы в один вектор, котрансфецированы, последовательно трансфецированы или по отдельности трансфецированы в клетки-хозяева, которые затем сливаются с образованием клетки-хозяина, экспрессирующей обе цепи.

Плазмиды для применения при конструировании векторов экспрессии были сконструированы так, что амплифицированные с помощью ПЦР последовательности кДНК V-тяжелой цепи и V-легкой каппа-цепи могут быть использованы для восстановления полных тяжелых и легких цепей. Указанные плазмиды можно применять для экспрессии полностью антител человека IgG₁к или IgG₄к. Полностью антитела человека и химерные антитела согласно настоящему изобретению также включают антитела IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM и IgD. Сходные плазмиды могут быть сконструированы для экспрессии других изоформ тяжелой цепи или для экспрессии антител, содержащих легкие ламбда-цепи.

Соответственно, в другом аспекте настоящего изобретения структурные признаки антител к CD40 согласно настоящему изобретению применяют для создания структурно родственных антител к CD40, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител согласно настоящему изобретению, такое как, например:

- (a) индукция или усиление иммунного ответа на антиген, независимо от связывания с рецептором Fc;
- (b) индукция или усиление иммунного ответа на антиген без индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) CD40-экспрессирующих клеток;
- (c) индукция или усиление иммунного ответа на антиген без индукции комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ) CD40-экспрессирующих клеток; и/или
- (d) способность к синергическому действию с CD40L; и/или дополнительные признаки могут включать, например:
 - (d) отсутствие ингибирования или блокирования связывания CD40L;
 - (e) ингибирование или блокирование связывания CD40L;
 - (f) ингибирование или блокирование связывания CD40L с CD40 человека, независимо от связывания с рецептором Fc;
 - (g) индукцию или усиление клеточного апоптоза опухолевой клетки;
 - (h) индукцию или усиление активности клетки, направленной на стимуляцию Т-клеток (например, измеренной на основании увеличения экспрессии ИЛ-12p40); и/или
 - (i) индукцию или усиление активации В-клеток (например, измеренной на основании увеличения

экспрессии по меньшей мере одного маркера клеточной поверхности, выбранного из группы, состоящей из HLA-DR V450, CD54-ФЭ, CD86-АФЦ и CD83 BV510, CD19 V500, CD54-ФЭ, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69-АФЦ, CD86-АФЦ, CD38 PerCP-Cy5.5 и CD71-ФЭ.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более участков CDR антител согласно настоящему изобретению могут быть рекомбинантно комбинированы с известными каркасными участками и CDR для создания дополнительных рекомбинантно-модифицированных антител к CD40 согласно настоящему изобретению. Каркасные участки переменных областей тяжелой и легкой цепей могут быть получены из последовательностей одних и тех же или разных антител. Последовательности антител могут представлять собой последовательности природных антител или могут представлять собой консенсусные последовательности нескольких антител. См. Kettleborough et al., *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger et al., *Protein Engineering* 6:971 (1993) и Carter et al., WO 92/22653.

Соответственно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения антитела к CD40, включающий: получение антитела, содержащего (1) каркасные участки тяжелой цепи и CDR тяжелой цепи, причем по меньшей мере один из CDR тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 103, 104, 105, 106, 107, 108; и (2) каркасные участки легкой цепи и CDR легкой цепи, причем по меньшей мере один из CDR легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 113, 114; при этом указанное антитело сохраняет способность связываться с CD40. Способность антитела связываться с CD40 может быть определена с использованием стандартных количественных исследований связывания, таких как те, которые указаны в примерах (например, ИФА или FLISA).

В данной области техники хорошо известно, что домены CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности связывания/аффинности антитела в отношении антигена (см. Hall et al., *J. Immunol.*, 149:1605-1612 (1992); Polymenis et al., *J. Immunol.*, 152:5318-5329 (1994); Jahn et al., *Immunobiol.*, 193:400-419 (1995); Klimka et al., *Brit. J. Cancer.*, 83:252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.*, 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2161-2162 (1994); Ditzel et al., *J. Immunol.*, 157:739-749 (1996)). Соответственно, рекомбинантные антитела согласно настоящему изобретению, полученные как изложено выше, предпочтительно содержат CDR3 из тяжелой и/или легкой цепей антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK и 3B6-NS. Антитела также могут содержать CDR2 из антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK и 3B6-NS. Антитела также могут содержать CDR1 из антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK и 3B6-NS. Антитела могут дополнительно содержать любые комбинации CDR.

Соответственно, согласно другому варианту реализации, настоящее изобретение также относится к антителам к CD40, содержащим: (1) каркасные участки тяжелой цепи, участок CDR1 тяжелой цепи, участок CDR2 тяжелой цепи и участок CDR3 тяжелой цепи, причем указанный участок CDR3 тяжелой цепи выбран из CDR3 антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, и (2) каркасные участки легкой цепи, участок CDR1 легкой цепи, участок CDR2 легкой цепи и участок CDR3 легкой цепи, причем указанный участок CDR3 легкой цепи выбран из CDR3 антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS, при этом указанное антитело связывается с CD40. Антитело может дополнительно содержать CDR2 тяжелой цепи и/или CDR2 легкой цепи антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS. Антитело может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи и/или CDR1 легкой цепи антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS.

Получение антител, имеющих модифицированные последовательности.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательности переменных областей, или их частей, антител к CD40 согласно настоящему изобретению модифицированы для создания структурно родственных антител к CD40, которые сохраняют способность к связыванию (т.е. с тем же эпитопом, как и немодифицированное антитело) и, следовательно, функционально эквивалентны. Способы выявления остатков, которые могут быть изменены без устранения связывания антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Marks et al. (*Biotechnology* (1992) 10(7):779-83 (диверсификация моноклональных антител путем перестановки переменных областей легкой цепи, затем переменных областей тяжелой цепи с фиксированными изменениями последовательности CDR3), Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12(9):899-903 (отбор антител человека, направленных к одному эпитопу антигена, из репертуара фагового дисплея), Sharon et al. (1986) *PNAS USA* 83(8):2628-31 (сайт-направленный мутагенез инвариантного аминокислотного остатка в соединении сегментов V-D антитела); Casson et al. (1995) *J. Immunol.* 155(12):5647-54 (эволюция потери и изменение специфичности в результате случайного мутагенеза переменной области тяжелой цепи антитела).

Соответственно, согласно одному аспекту настоящего изобретения участки CDR1, 2 и/или 3 модифицированных антител, описанных выше, могут содержать точную аминокислотную последовательность (последовательности), такую как последовательности антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK

или 3B6-NS, раскрытые в настоящем документе. Однако согласно другим аспектам настоящего изобретения антитела содержат производные точных последовательностей CDR антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS, но по-прежнему сохраняют способность связываться с CD40. Такие модификации последовательности могут включать одну или более добавок, делеций или замен аминокислот, например, консервативные модификации последовательности, описанные выше. Модификации последовательности также могут быть основаны на консенсусных последовательностях, описанных выше для конкретных последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS.

Соответственно, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения модифицированное антитело может состоять из одного или более CDR, которые, например, на 90, 95, 98 или 99,5% идентичны одному или более CDR из антител 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK или 3B6-NS. Понимается, что диапазоны, которые являются промежуточными по отношению к указанным выше значениям, например, CDR, которые на 90-95%, 95-98% или 98-100% идентичны одной или более из вышеперечисленных последовательностей, также включены в объем настоящего изобретения.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения один или более остатков CDR могут быть изменены для модификации связывания, чтобы достичь более благоприятной скорости прямой реакции связывания, более благоприятной скорости обратной реакции связывания или и того и другого, так, что достигается идеальная константа связывания. Используя эту стратегию, может быть получено антитело, имеющее сверхвысокую аффинность связывания, например, 10^{10} M^{-1} или более. Методики созревания аффинности, хорошо известные в данной области техники и описанные в настоящем документе, можно применять для изменения участка (участков) CDR с последующим скринингом полученных связывающих молекул для выявления желательного изменения связывания. Соответственно, поскольку участок (участки) CDR изменен, изменения аффинности связывания, а также иммуногенности можно контролировать и оценивать так, чтобы получить антитело, оптимизированное для лучшего комбинированного связывания и низкой иммуногенности.

В дополнение к модификациям в CDR или вместо них модификации могут быть сделаны в пределах одного или более каркасных участков, FR1, FR2, FR3 и FR4, переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела, до тех пор, пока такие модификации не устраняют аффинность связывания антитела. Например, один или более остатков аминокислот, не относящихся к зародышевой линии, в каркасных участках переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела согласно настоящему изобретению заменены остатком аминокислоты зародышевой линии, т.е. соответствующим остатком аминокислоты в последовательности зародышевой линии человека для переменной области тяжелой или легкой цепей, с которой антитело имеет значительную идентичность последовательности. Например, цепь антитела может быть выровнена с цепью антитела зародышевой линии, с которой она имеет значительную идентичность последовательности, и остатки аминокислот, которые не совпадают между каркасной последовательностью антитела и каркасом цепи зародышевой линии, могут быть заменены соответствующими остатками из последовательности зародышевой линии. Если аминокислота отличается между каркасным участком переменной области антитела и эквивалентным каркасным участком переменной области последовательности зародышевой линии человека, то аминокислота каркасного участка антитела обычно должна быть заменена эквивалентной аминокислотой из последовательности зародышевой линии человека, если есть основания полагать, что аминокислота попадает в одну из следующих категорий:

- (1) остаток аминокислоты, который непосредственно нековалентно связывается с антигеном;
- (2) остаток аминокислоты, который находится рядом с участком CDR;
- (3) остаток аминокислоты, который иным образом взаимодействует с участком CDR (например, находится в пределах приблизительно 3-6 Å от участка CDR, согласно результатам определения с помощью компьютерного моделирования); или
- (4) остаток аминокислоты, который участвует в создании границы раздела VL-VH.

Остатки, которые "непосредственно нековалентно связываются с антигеном", включают аминокислоты в каркасных участках в положениях, которые имеют высокую вероятность непосредственного взаимодействия с аминокислотами на антигене в соответствии с установленными химическими силами, например, с помощью водородной связи, сил Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий и т.п. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения остаток аминокислоты в каркасном участке антитела согласно настоящему изобретению заменен соответствующим остатком аминокислоты зародышевой линии, который непосредственно нековалентно связывается с антигеном.

Остатки, которые "прилегают к участку CDR", включают остатки аминокислот в положениях, непосредственно примыкающих к одному или более CDR в первичной последовательности антитела, например, в положениях, непосредственно примыкающих к CDR, определенных Кабат (Kabat), или CDR, определенных Чотиа (Chothia) (см., например, Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, остаток аминокислоты в каркасном участке антитела согласно настоящему изобретению заменен соответствующим остатком аминокислоты зародышевой линии, который примыкает к участку CDR.

Остатки, которые "иным образом взаимодействуют с участком CDR", включают те остатки, кото-

рые, как определено с помощью исследования вторичной структуры, находятся в пространственной ориентации, достаточной для воздействия на участок CDR. Такие аминокислоты, как правило, имеют атом боковой цепи в пределах приблизительно 3 ангстрем (Å) от некоторого атома в CDR и должны содержать атом, который может взаимодействовать с атомами CDR в соответствии с установленными химическими силами, такими как те, которые перечислены выше. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, остаток аминокислоты в каркасном участке антитела согласно настоящему изобретению заменен соответствующим остатком аминокислоты зародышевой линии, который иным образом взаимодействует с участком CDR.

Известно, что аминокислоты в нескольких положениях в каркасе важны для определения конформации CDR (например, способны взаимодействовать с CDR) во многих антителах (Chothia и Lesk, выше, Chothia et al., выше, и Gramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990), все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Авторы указанных литературных источников выявили консервативные каркасные остатки, важные для конформации CDR, путем исследования структур нескольких известных антител. Исследованные антитела входили в ограниченное число структурных или "канонических" классов на основании конформации CDR. Консервативные остатки каркаса в последовательностях членов канонического класса называются "каноническими" остатками. Канонические остатки включают остатки 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 и 95 легкой цепи и остатки 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 и 94 тяжелой цепи. Дополнительные остатки (например, остатки, определяющие структуру CDR) могут быть идентифицированы в соответствии с методологией Martin and Thornton (1996) J. Mol. Biol. 263:800. Примечательно, что аминокислоты в положениях 2, 48, 64 и 71 легкой цепи и 26-30, 71 и 94 тяжелой цепи (нумерация по Кабат), как известно, способны взаимодействовать с CDR во многих антителах. Аминокислоты в положениях 35 в легкой цепи и 93 и 103 в тяжелой цепи также, вероятно, могут взаимодействовать с CDR. Дополнительные остатки, которые могут влиять на конформацию CDR, могут быть идентифицированы в соответствии с методологией Foote and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487. Такие остатки называются "вернерными" остатками и представляют собой остатки в каркасном участке, располагающиеся непосредственно под (т.е. образующие "платформу" под) CDR.

Остатки, которые "участвуют в образовании границы раздела VL-VH" или "упаковывающие остатки", включают остатки на границе раздела VL и VH, определенные, например, Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) или Chothia et al., выше.

Иногда возникает некоторое разночтение в отношении того, попадает ли конкретная аминокислота в одну или более из вышеупомянутых категорий. В таких случаях получают альтернативные варианты антител, одно из которых содержит данную конкретную замену, а другое не содержит. Альтернативные варианты антител, полученные таким способом, могут быть испытаны в любом из количественных исследований, описанных в настоящем документе для определения желательной активности, с отбором предпочтительного антитела.

Дополнительными кандидатами для замены в каркасном участке являются аминокислоты, которые являются необычными или "редкими" для антитела в этом положении. Такие аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентного положения последовательности зародышевой линии человека или из эквивалентных положений более типичных антител. Например, замена может быть желательной, если аминокислота в каркасном участке антитела является редкой для данного положения, и соответствующая аминокислота в последовательности зародышевой линии является обычной для данного положения в последовательностях иммуноглобулинов; или если аминокислота в антителе является редкой для данного положения, и соответствующая аминокислота в последовательности зародышевой линии также является редкой по сравнению с другими последовательностями. Подразумевается, что антитело может быть сделано менее иммуногенным путем замены необычной аминокислоты аминокислотой из последовательности зародышевой линии, которая является типичной для антител. Замена также может быть желательной, например, в случае неспаренных остатков цистеина или предполагаемых сайтов N-гликозилирования.

В настоящем документе термин "редкий" означает аминокислоту, присутствующую в данном положении менее чем в приблизительно 20%, предпочтительно менее чем в приблизительно 10%, более предпочтительно менее чем в приблизительно 5%, еще более предпочтительно менее чем в приблизительно 3%, даже более предпочтительно менее чем в приблизительно 2% и даже более предпочтительно менее чем в приблизительно 1% последовательностей в репрезентативной выборке последовательностей, и в настоящем документе термин "обычный" означает аминокислоту, присутствующую более чем в приблизительно 25%, но обычно более чем в приблизительно 50% последовательностей в репрезентативной выборке. Например, все последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепей соответствующим образом сгруппированы в "подгруппы" последовательностей, которые являются особенно гомологичными друг другу и содержат одни и те же аминокислоты в определенных крайне важных положениях (Kabat et al., выше). При определении того, является ли аминокислота в последовательности антитела "редкой" или "обычной" среди последовательностей, обычно предпочтительным будет рассмотрение только тех последовательностей, которые входят в ту же подгруппу, что и последовательность антитела.

В целом, каркасные участки антител обычно, по существу, идентичны и, более обычно, идентичны

каркасным участкам последовательностей зародышевой линии человека, из которых они были получены. Действительно, многие аминокислоты в каркасном участке практически не влияют на специфичность или аффинность антитела. Следовательно, многие индивидуальные консервативные замены каркасных участков могут быть допустимы без заметного изменения специфичности или аффинности полученного иммуноглобулина. Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность каркасного участка варибельной области антитела по меньшей мере на 85% идентична последовательности каркасного участка варибельной области зародышевой линии человека или консенсусной области таких последовательностей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения последовательность каркасного участка варибельной области антитела по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности каркасного участка варибельной области зародышевой линии человека или консенсусной области таких последовательностей.

Помимо простого связывания CD40 антитело может быть отобрано на основании его способности сохранять другие функциональные свойства антител согласно настоящему изобретению, такие как, например:

- (a) индукция или усиление иммунного ответа на антиген, независимо от связывания с рецептором Fc;
 - (b) индукция или усиление иммунного ответа на антиген без индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) CD40-экспрессирующих клеток;
 - (c) индукция или усиление иммунного ответа на антиген без индукции комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ) CD40-экспрессирующих клеток; и/или
 - (d) способность к синергическому действию с CD40L.
- Дополнительные признаки могут включать, например:
- (e) отсутствие блокирования связывания CD40L с CD40 человека, независимо от связывания с рецептором Fc;
 - (e) блокирование связывания CD40L с CD40 человека, независимо от связывания с рецептором Fc;
 - (g) активацию CD40 человека, экспрессированного на АПК, независимо от связывания с рецептором Fc;
 - (h) индукцию апоптоза опухолевой клетки;
 - (i) активность, направленную на стимуляцию Т-клеток; и/или
 - (j) усиленную активацию В-клеток.

Характеристика моноклональных антител к CD40.

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению могут быть охарактеризованы в отношении связывания с CD40 с использованием множества известных методик. Обычно антитела в первую очередь характеризуют с помощью ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования могут быть покрыты очищенным CD40 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и затем блокированы с использованием нецелевых белков, таких как бычий сывороточный альбумин (БСА), разбавленный в ФСБ. Разведения плазмы крови мышей, иммунизированных CD40, добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 часов при 37°C. Планшеты промывают ФСБ/твин-20 и затем инкубируют с поликлональным реагентом козы к IgG Fc человека, конъюгированным со щелочной фосфатазой, в течение 1 часа при 37°C. После промывания окрашивание в планшетах проявляют с использованием субстрата ABTS и оценивают оптическую плотность при длине волны 405 нм (OD₄₀₅). Предпочтительно для слияний будут использованы клетки мышей, у которых вырабатывались самые высокие титры.

Количественное исследование методом ИФА, описанное выше, можно использовать для скрининга антитела и, следовательно, гибридом, которые вырабатывают антитела, которые проявляют положительную реактивность с иммуногеном CD40. Гибридомы, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с CD40, затем могут быть субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реакционную способность исходных клеток (согласно результатам ИФА), затем может быть отобран для получения банка клеток и для очистки антител.

Чтобы очистить антитела к CD40, отобранные гибридомы могут быть размножены в роллерных бутылках, двухлитровых колбах с перемешиванием или других системах культивирования. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией на носителе протеин А-сефароза (Pharmacia, Пискатеуей, Нью-Джерси, США) для очистки белка. После обмена буфера на ФСБ концентрацию можно определить на основании значений OD₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43 или предпочтительно с помощью нефелометрического анализа. IgG может быть проверен с помощью гель-электрофореза и антигенспецифического способа.

Чтобы определить, связываются ли отобранные моноклональные антитела к CD40 с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США). Связывание биотинилированного МАТ можно детектировать с помощью меченого стрептавидинового зонда. Для определения изотипа очищенных антител может быть выполнен ИФА для определения изотипа с использованием методик, общепризнанных в данной области техники. Например, лунки планшетов для микротитрования могут быть покрыты 10 мкг/мл анти-Ig в течение ночи при 4°C. После блокирования с использованием 5% БСА планшеты подвергают вза-

имодействию с 10 мкг/мл моноклональных антител или очищенного антитела для контроля изотипа при температуре окружающей среды в течение двух часов. Затем лунки могут быть подвергнуты взаимодействию либо с IgG1, либо с другими конъюгированными зондами, специфическими для изотипа. Окрашивание в планшетах проявляют и исследуют, как описано выше.

Связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими CD40, может быть испытано с помощью проточной цитометрии. В общих чертах, линии клеток и/или МКПК человека, экспрессирующие связанный с мембраной CD40 (выращенные в стандартных условиях культивирования), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в ФСБ, содержащем 0,1% БСА, при 4°C в течение 1 часа. После промывания клетки подвергают взаимодействию с меченым флуоресцеином антителом к IgG в условиях, аналогичных таковым при окрашивании первичным антителом. Образцы могут быть исследованы с помощью прибора FACScan с использованием свойств рассеяния света и бокового рассеяния для пропуска отдельных клеток и определения связывания меченых антител. Может быть применен альтернативный способ количественного исследования с использованием флуоресцентной микроскопии помимо проточной цитометрии или вместо нее. Клетки можно окрашивать с помощью способа, идентичного тому, который описан выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может иметь сниженную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

Способность IgG, направленных против CD40, реагировать с антигеном CD40 также может быть испытана с помощью Вестерн-блоттинга. В общих чертах, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих CD40, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза отделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют 20% мышьиной сывороткой и исследуют, используя в качестве зонда моноклональные антитела, подлежащие испытанию. Связывание IgG можно детектировать с использованием антитела к IgG, конъюгированного со щелочной фосфатазой, и окрашивание можно проявлять с использованием таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури, США).

Способы исследования аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к CD40 включают стандартные количественные исследования, известные в данной области техники, например, поверхностный плазмонный резонанс Biacore (SPR) с использованием прибора Biacore 2000 SPR (Biacore AB, Уппсала, Швеция) или интерферометрию биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK^c, как описано в примерах.

Настоящее изобретение также относится к агонистическим антителам к CD40, которые связываются с тем же эпитопом, как и антитела к CD40, 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK и 3B6-NS (согласно результатам определения с помощью конкретной методики картирования эпитопа). Например, как описано в примере 17, антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 3C3) связываются с одним или более остатками в пределах участка, содержащего остатки аминокислот 1-5 и 33-36 внеклеточного домена (ВКД) CD40 человека (SEQ ID NO: 133), например, аминокислоты 5, 33, 34 и/или 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133). Показано, что антитело 3C3 дополнительно связывается с одной или более аминокислотами 26, 28 и/или 30 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133), например, аминокислотами 5, 33, 34 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133) или аминокислотами 5, 33 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133).

Другие антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 3G5) связываются с одним или более остатками в пределах участка, содержащего остатки аминокислот 13-15 и 33-36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133), например, аминокислоты 33, 34 и 36 ВКД CD40 человека (SEQ ID NO: 133).

Антитела, которые связываются с эпитопами на CD40 человека, описанные в настоящем документе (например, с теми же эпитопами, как и примерные антитела), проявляют терапевтически полезные свойства. Например, как показано в примере 16 и 20, антитела 3C3 проявляют синергическое агонистическое действие с растворимым лигандом CD40 (sCD40L), измеренное, например, на основании увеличения индукции экспрессии CD95 при инкубации с клетками линии Ramos, увеличения пролиферации В-клеток при инкубации с В-клетками человека и/или увеличения индукции экспрессии ИЛ-12p40 при инкубации с дендритными клетками.

Соответственно, антитела, которые связываются с тем же эпитопом, как и 3C3, способны к синергическому действию с другими терапевтическими агентами, включая те, которые связываются с сайтом связывания лиганда CD40 человека. Типичные синергические эффекты включают, например, повышение иммунной функции (например, опосредуемые Т-клетками иммунные ответы как при различных видах вакцинации, активация NK-клеток при различных видах терапии рака), ингибирование размножения клеток (например, при терапии рака) и/или усиление процессинга и презентации антигена АПК (например, при вакцинации).

Как описано в настоящем документе, методики определения антител, которые связываются с "одним и тем же эпитопом на CD40", как и антитела, описанные в настоящем документе, включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгенографические исследования кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. Другие способы позволяют контролировать связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена,

при этом потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто рассматривается как указание на эпитопный компонент. Помимо этого для картирования эпитопов также можно использовать вычислительные комбинаторные методы. Методы также могут быть основаны на способности антитела, представляющего интерес, обеспечивать аффинное выделение специфических коротких пептидов (либо в нативной трехмерной форме, либо в денатурированной форме) из комбинаторных библиотек пептидов для фагового дисплея. Пептиды затем рассматривают как инструмент для определения эпитопа, соответствующего антителу, использованному для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, обеспечивают картирование конформационных прерывистых эпитопов.

II. Молекулярные конъюгаты/иммунотоксины.

Настоящее изобретение относится к различным терапевтическим молекулярным конъюгатам (например, к конъюгированным вакцинам), которые содержат антиген, такой как опухолевый или вирусный антиген, соединенный с антителом, которое связывается с рецептором на АПК, например, антителом, которое связывается с CD40. Это позволяет нацеливать антиген на АПК, такие как клетки, экспрессирующие CD40 (например, дендритные клетки, В-клетки и макрофаги) для усиления процессинга, презентации и, в конечном итоге, иммунного ответа против антигена (ов). Схематическое изображение такого конъюгата представлено на фиг. 18, на которой, например, антиген генетически гибридизован с доменом СН3 каждой из тяжелых цепей, по существу полного антитела к CD40. Однако следует понимать, что антиген может быть альтернативно соединен с другими частями такого антитела или его фрагмента и что также можно применять другие формы конъюгации, такие как химическая конъюгация, как обсуждается ниже.

Антигены, подходящие для использования в молекулярных конъюгатах, включают, например, антигены инфекционных заболеваний и опухолевые антигены, против которых желательны защитные или терапевтические иммунные ответы, например, антигены, экспрессируемые опухолевой клеткой или патогенным организмом, или антигены инфекционных заболеваний. Например, подходящие антигены включают ассоциированные с опухолью антигены для предотвращения или лечения рака. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают, но не ограничиваются указанными, последовательности, содержащие полные последовательности или их часть антигенов β hCG, gp100 или Pmel17, HER2/neu, WT1, мезотелина, CEA, gp100, MART1, TRP-2, мелана-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), идиотипа, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, тирозиназы, теломеразы, SSSX2 и MUC-1, а также опухолевые антигены, происходящие из зародышевых клеток. Ассоциированные с опухолью антигены также включают антигены группы крови, например, антигены Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. В другом варианте в конструкции антиген-антитело согласно настоящему изобретению может быть включено более одного антигена. Например, антиген MAGE может быть комбинирован с другими антигенами, такими как меланин А, тирозиназа и gp100, наряду с адьювантами, такими как ГМ-КСФ или ИЛ-12, и соединен с антителом, нацеленным к АПК.

Другие подходящие антигены включают вирусные антигены для предотвращения или лечения вирусных заболеваний. Примеры вирусных антигенов включают, но не ограничиваются указанными, gag ВИЧ-1, env ВИЧ-1, nef ВИЧ-1, ВГВ (поверхностные или коровые антигены), ВПЧ, FAS, ВПГ-1, ВПГ-2, p17, ORF2 и ORF3. Примеры бактериальных антигенов включают, но не ограничиваются указанными, *Toxoplasma gondii* или *Treponema pallidum*. Конъюгаты антитело-бактериальный антиген согласно настоящему изобретению можно применять при лечении или предотвращении различных бактериальных заболеваний, таких как сибирская язва, ботулизм, столбняк, хламидиоз, холера, дифтерия, болезнь Лайма, сифилис и туберкулез.

Последовательности описанных выше антигенов хорошо известны в данной области техники. Например, пример последовательности кДНК MAGE-3 приведен в патенте США № 6235525 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности NY-ESO-1 приведены в патентах США № 5804381 и 6069233 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и последовательности белка мелана-A приведены в патентах США № 5620886 и 5854203 (Институт исследований рака Людвиг); примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности NY-BR-1 приведены в патентах США № 6774226 и 6911529 (Институт исследований рака Людвиг), и примеры последовательности нуклеиновой кислоты и белковой последовательности NY-CO-58 приведены в WO 02090986 (Институт исследований рака Людвиг); пример аминокислотной последовательности белка HER-2/neu доступен в GenBank® под номером доступа AAA58637; и нуклеотидная последовательность (мРНК) для сходного с карциноэмбриональным антигеном белка 1 человека (CEA-1) доступна в GenBank® под номером доступа NM_020219.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген представляет собой антиген ВПЧ, например, антиген ВПЧ-16, антиген ВПЧ-18, антиген ВПЧ-31, антиген ВПЧ-33 и/или антиген ВПЧ-35. Геном ВПЧ-16 описан в *Virology*, 145:181-185 (1985), и последовательности ДНК, кодирующие ВПЧ-18, описаны в патенте США № 5840306, раскрытие которого полностью включено в настоящий

документ посредством ссылки. Антигены ВПЧ-16 (например, серореактивные области белков E1 и/или E2 ВПЧ-16) описаны в патенте США № 6531127 и антигены ВПЧ-18 (например, серореактивные области белков L1 и/или L2 ВПЧ-18) описаны в патенте США № 5840306, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аналогичным образом, полный геном ВГВ доступен в GenBank® под номером доступа NC_003977, раскрытие которого включено в настоящий документ. Геном ВГС описан в Европейской заявке на патент № 318216, раскрытие которой включено в настоящий документ. В PCT/US90/01348, включенном в настоящий документ посредством ссылки, раскрыта информация о последовательности клонов генома ВГС, аминокислотные последовательности вирусных белков ВГС и способы получения и применения таких композиций для вакцин против ВГС, содержащих белки ВГС и полученные из них пептиды.

Антигенные пептиды белков (т.е. те, которые содержат Т-клеточные эпитопы) могут быть выявлены различными способами, хорошо известными в данной области техники. Например, Т-клеточные эпитопы можно предсказать путем исследования последовательности белка с использованием предсказательных алгоритмов, доступных через интернет (BIMAS & SYFPEITHI), для создания потенциальных пептидов, связывающихся с ГКГС класса I и II, которые соответствуют внутренней базе данных 10000 хорошо охарактеризованных ГКГС-связывающих пептидов, ранее определенных с помощью ЦТЛ. Пептиды с высокими оценками могут быть разделены на классы и отобраны как "интересные" на основании высокой аффинности в отношении данной молекулы ГКГС.

Другой способ выявления антигенных пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, включает разделение белка на неперекрывающиеся пептиды желаемой длины или перекрывающиеся пептиды желаемой длины, которые могут быть получены рекомбинантными, синтетическими способами или, в определенных ограниченных ситуациях, путем химического расщепления белка, и испытаны для выявления иммуногенных свойств, например, способности вызывать ответ Т-клеток (т.е. пролиферацию или секрецию лимфокинов).

Для того чтобы определить точные Т-клеточные эпитопы белка, например, с помощью методик точного картирования эпитопа, пептид, обладающий активностью, направленной на стимуляцию Т-клеток, и, следовательно, содержащий по меньшей мере один Т-клеточный эпитоп, определенный с помощью методик биологии Т-клеток, может быть модифицирован путем добавления или делеции остатков аминокислот на амино- или карбокси-конце пептида и испытан для определения изменения реактивности Т-клеток в отношении модифицированного пептида. Если обнаружено, что два или более пептидов, которые имеют область перекрывания в нативной белковой последовательности, обладают активностью, направленной на стимуляцию Т-клеток человека, определенной с помощью методик биологии Т-клеток, то могут быть получены дополнительные пептиды, содержащие такие полные пептиды или их часть, и такие дополнительные пептиды могут быть испытаны с помощью аналогичной процедуры. Следуя этой методике, пептиды отбирают и получают рекомбинантными или синтетическими способами. Пептиды отбирают на основании различных факторов, включая интенсивность ответа Т-клеток на пептид (например, индекс стимуляции). Физические и химические свойства таких отобранных пептидов (например, растворимость, стабильность) затем могут быть исследованы для определения пригодности пептидов для применения в терапевтических композициях или необходимости модификации пептидов.

Помимо этого конъюгированная вакцина может содержать один или более иммуностимулирующих агентов, которые также усиливают иммунный ответ против антигена. Конъюгированные вакцины анти-тело-антиген согласно настоящему изобретению могут быть получены генетическими или химическими способами. В любом случае антительная часть конъюгата может состоять из полного антитела или части антитела, такой как фрагмент Fab или одноцепочечный Fv. Помимо этого в конъюгат может быть включено более одного антигена и/или иммуностимулирующего агента.

Химически сконструированные конъюгаты анти-тело-антиген могут быть получены с использованием ряда хорошо известных и легко доступных сшивающих реагентов. Подходящие сшивающие реагенты могут представлять собой гомофункциональные или гетерофункциональные соединения, такие как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-3-ацетилтиоацетат (SATA), сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), 5,5'-дितिобис-2-нитробензойную кислоту (DTNB), которые образуют ковалентные связи с различными реакционноспособными аминокислотными или боковыми цепями углеводов на антителе, нацеленном к ДК, и выбранном антигене. Другие связывающие и сшивающие агенты также можно применять для получения ковалентных связей, такие как протеин А, карбодиимид и о-фенилендималеимид (oPDM); (см., например, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Другие способы включают те, которые описаны Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83), и Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Предпочтительными конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс, США). Иммуностимулирующие агенты также могут быть химически соединены с молекулярными конъюгатами согласно настоящему изобретению, используя те же способы соединения, которые описаны выше.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему

изобретению соединены с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственный препарат или радиоизотоп. Если антитела конъюгированы с цитотоксином, такие конъюгаты антител называются "иммунотоксинами". Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который вреден (например, вызывает гибель) для клеток. Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин, а также их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты включают, но не ограничиваются указанными, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)), и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин). Антитело согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с радиоизотопом, например, радиоактивным йодом, для получения цитотоксических радиофармацевтических препаратов для лечения расстройства, связанного с дендритными клетками, такого как аутоиммунное или воспалительное заболевание, или болезнь "трансплантат против хозяина".

Конъюгаты антител согласно настоящему изобретению можно применять для модификации определенного биологического ответа, и лекарственный фрагмент не следует истолковывать как ограниченный классическими химическими терапевтическими агентами. Например, лекарственный фрагмент может представлять собой белок или полипептид, обладающий желательной биологической активностью. Подходящие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон- γ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 ("ИЛ-1"), интерлейкин-2 ("ИЛ-2"), интерлейкин-6 ("ИЛ-6"), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("ГМ-КСФ"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("Г-КСФ") или другие факторы роста.

Методики конъюгирования такого терапевтического фрагмента с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

III. Композиции.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция, например, композиция, содержащая одно или более моноклональных антител согласно настоящему изобретению, приготовленная совместно с носителем (например, фармацевтически приемлемым носителем). Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим биспецифические молекулы, которые содержат антитело согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции содержат комбинацию нескольких (например, двух или более) выделенных антител согласно настоящему изобретению. Предпочтительно каждое из антител композиции связывается с отдельным, предварительно отобраным эпитопом CD40.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также можно вводить в виде комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать композицию согласно настоящему изобретению с по меньшей мере одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как противовоспалительные агенты, DMARD (противоревматические препараты, модифицирующие течение болезни), иммуносупрессорные агенты и химиотерапевтические агенты. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также можно вводить в комбинации с лучевой терапией. Совместное введение с другими антителами также включено в объем настоящего изобретения.

В настоящем документе термины "носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель" включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, биспецифическая и полиспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других

природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Примеры адъювантов, которые можно применять с антителами и конструкциями согласно настоящему изобретению, включают: неполный адъювант Фрейнда и полный адъювант Фрейнда (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Рэуей, Нью-Джерси, США); AS-2 (SmithKline Beecham, Филадельфия, Пенсильвания, США); соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия; соли кальция, железа или цинка; нерастворимую суспензию ацилированного тирозина; ацилированные сахара; катионно-или анионно-дериватизированные полисахариды; полифосфазены; биоразлагаемые микросферы; цитокины, такие как ГМ-КСФ, интерлейкин-2, -7, -12 и другие подобные факторы; 3Д-МФЛ; олигонуклеотид CpG; и монофосфориллипид А, например, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А.

Адъюванты МФЛ доступны от Corixa Corporation (Сизтл, Вашингтон, США, см., например, патенты США № 4436727, 4877611, 4866034 и 4912094). CpG-содержащие олигонуклеотиды (в которых динуклеотид CpG не метилирован) хорошо известны и описаны, например, в WO 96/02555, WO 99/33488 и патентах США № 6008200 и 5856462. Иммуностимулирующие последовательности ДНК также описаны, например, Sato et al., *Science* 273:352, 1996.

Другие альтернативные адъюванты включают, например, сапонины, такие как Quil А или его производные, включая QS21 и QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Фрамингем, Массачусетс, США); эскин; дигитонин; или сапонины Gypsophila или Chenopodium quinoa; Montanide ISA 720 (Seppic, Франция); SAF (Chiron, Калифорния, США); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); серию адъювантов SBAS (например, SBAS-2 или SBAS-4, доступные от SmithKline Beecham, Риксансар, Бельгия); детокс (энханзин™) (Corixa, Гамильтон, Монтана, США); RC-529 (Corixa, Гамильтон, Монтана, США) и другие аминокилглюкозаминид-4-фосфаты (AGP); адъюванты на основе простых эфиров полиоксиэтилена, такие как те, которые описаны в WO 99/52549A1; синтетические имидазохинолины, такие как имиквимод [S-26308, R-837] (Harrison, et al., *Vaccine* 19: 1820-1826, 2001) и резиквимод [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., *Cellular immunology* 204: 64-74, 2000); основания Шиффа карбониллов и аминов, которые конститутивно экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках и поверхностях Т-клеток, такие как тукарезол (Rhodes, J. et al., *Nature* 377: 71-75, 1995), цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, такие как белок или пептид, включая, например, провоспалительные цитокины, такие как интерферон, ГМ-КСФ, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, TGF-альфа и TGF-бета, индукторы Th1, такие как интерферон-гамма, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и ИЛ-21, индукторы Th2, такие как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 и другие хемокины, и костимулирующие гены, такие как MCP-1, MIP-1 альфа, MIP-1 бета, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 и CD70; иммуностимулирующие агенты, нацеленные на лиганды, такие как CTLA-4 и L-селектин, стимулирующие апоптоз белки и пептиды, такие как Fas; синтетические адъюванты на основе липидов, такие как ваксфектин (Reyes et al., *Vaccine* 19: 3778-3786, 2001), сквален, альфа-токоферол, полисорбат 80, DOPC и холестерин; эндотоксин, [ЛПС], (Beutler, B., *Current Opinion in Microbiology* 3:23-30, 2000); лиганды, которые запускают Toll-рецепторы для выработки Th1-индуцирующих цитокинов, такие как синтетические микобактериальные липопротеины, микобактериальный белок p19, пептидогликан, тейхоевая кислота и липид А; и ХТ (холерный токсин, субъединицы А и В) и LT (термолabileный энтеротоксин из *E. coli*, субъединицы А и В), семейства белков теплового шока (HSP) и LLO (листериолизин О, WO 01/72329). Перечисленные и различные другие агонисты Toll-подобного рецептора (TLR) описаны, например, в Kanzler et al., *Nature Medicine*, May 2007, Vol 13, No 5. Предпочтительным иммуностимулирующим агентом для применения в комбинации с антителом к CD40 согласно настоящему изобретению является агонист TLR3, такой как поли-IC.

"Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического действия (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфорная и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и тому подобное. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композицию согласно настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, что путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желательных результатов. Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и системы доставки, заключенные в микрокапсулы. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиорто-

эффиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или известны специалистам в данной области техники. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Для введения соединения согласно настоящему изобретению с помощью определенных путей введения может потребоваться нанесение покрытия на это соединение или совместное введение соединения с материалом, предотвращающим его инактивацию. Например, соединение может быть введено субъекту в подходящем носителе, например, липосомах, или разбавителе. Приемлемые разбавители включают солевые и водные буферные растворы. Липосомы включают эмульсии "вода-в-масле в воде" CGF, а также обычные липосомы (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любые обычные среды или агент не совместимы с активным соединением, в объеме настоящего изобретения включено их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических агентов, например, Сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией путем микрофльтрации. Обычно дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, выбранные из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из раствора, ранее стерилизованного путем фильтрации.

Схемы дозирования корректируют так, чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно вводить один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены на протяжении определенного периода времени, или доза может быть пропорционально снижена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут быть введены один или два раза в неделю путем подкожной или внутримышечной инъекции или один или два раза в месяц путем подкожной или внутримышечной инъекции.

Особенно полезным является приготовление композиций для парентерального введения в виде стандартной лекарственной формы для удобства введения и единообразия дозировки. В настоящем документе стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желательного терапевтического действия в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Описание стандартной лекарственной формы согласно настоящему изобретению обусловлено и зависит непосредственно от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического действия, которое должно быть достигнуто, и (б) исходных ограничений технологии смешивания такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропиленгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

В случае терапевтических композиций составы согласно настоящему изобретению включают те, которые подходят для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Для удобства составы могут быть представлены

в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены любыми способами, известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной стандартной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной стандартной лекарственной формы, обычно будет представлять собой такое количество композиции, которое обеспечивает терапевтическое действие. Обычно из ста процентов такое количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно девяноста процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,005 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 0,01 до приблизительно 30%.

Составы согласно настоящему изобретению, которые пригодны для вагинального введения, также включают пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или аэрозольные составы, содержащие носители, которые известны в данной области техники. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения композиций согласно настоящему изобретению включают порошки, аэрозольные препараты, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, патчи и ингаляционные препараты. Активное соединение можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

В настоящем документе выражения "парентеральное введение" и "вводимые парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, но не ограничиваются указанными, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Подходящие композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как с помощью процедур стерилизации, описанных выше, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Желательным также может быть включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Помимо этого пролонгированное всасывание фармацевтической формы для инъекций может быть обеспечено путем включения агентов, которые задерживают всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В случае если соединения согласно настоящему изобретению вводят в виде фармацевтических препаратов, человеку и животным, они могут быть введены по отдельности или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,001 до 90% (более предпочтительно от 0,005 до 70%, например, от 0,01 до 30%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Независимо от выбранного пути введения соединения согласно настоящему изобретению, которые можно применять в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению получают в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут варьироваться так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций согласно настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выделения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных препаратов, соединений и/или материалов, использованных в комбинации с конкретными примененными композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни пациента, которого лечат, и подобных факторов, хорошо известных в медицине. Врач или ветеринар, имеющий стандартную квалификацию в данной области техники, может легко определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать введение доз соединений согласно настоящему изобретению, примененных в фармацевтической композиции, на более низких уровнях, чем те, которые требуются для достижения желательного терапевтического действия, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желательного действия. Обычно подходящая суточная доза композиции согласно настоящему изобре-

нию составит то количество соединения, которое представляет собой самую низкую дозу, эффективную для получения терапевтического действия. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше. Предпочтительный способ введения включает внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное или подкожное введение, предпочтительно проксимально относительно целевого места. При необходимости, эффективную суточную дозу терапевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых по отдельности через соответствующие интервалы времени в течение суток, необязательно, в виде стандартных лекарственных форм. Несмотря на то, что соединение согласно настоящему изобретению может быть введено по отдельности, предпочтительным является введение соединения в виде фармацевтического состава (композиции).

Терапевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте реализации, терапевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена с помощью устройства для подкожных инъекций без иглы, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824, или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, которые можно применять в настоящем изобретении, включают: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для введения лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат с регулируемой скоростью потока для непрерывной доставки лекарственного препарата; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного препарата, имеющая многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного препарата. Специалистам в данной области техники известны многие другие подходящие имплантаты, системы доставки и модули.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены, чтобы обеспечить надлежащее распределение в условиях *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения согласно настоящему изобретению пересекут ГЭБ (если необходимо), они могут быть приготовлены, например, в липосомах. Способы получения липосом описаны, например, в патентах США № 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов, которые селективно переносятся в определенные клетки или органы, повышая тем самым целевую доставку лекарственного препарата (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Примерные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор протеина А сурфактанта (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); различные виды которого могут содержать составы согласно изобретениям, а также компоненты изобретенных молекул; p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); также см. K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения терапевтические соединения согласно настоящему изобретению приготовлены в липосомах; в более предпочтительном варианте реализации липосомы включают нацеливающий фрагмент. В наиболее предпочтительном варианте реализации терапевтические соединения в липосомах доставляют путем болюсной инъекции в участок, ближайший к опухоли или очагу инфекции. Композиция должна быть жидкой в такой степени, чтобы обеспечить проходимость через иглу. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть устойчива к загрязняющему действию микроорганизмов, таких как бактерии и грибки.

Способность соединения ингибировать рак можно оценить в модельной системе на животных, которая позволяет прогнозировать эффективность в опухолях человека. В другом варианте это свойство композиции можно оценить, исследуя ингибиторную способность соединения, такое ингибирование можно оценить в условиях *in vitro* с помощью количественных способов исследований, известных квалифицированному практику. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным образом улучшить симптомы у субъекта. Специалист в данной области техники сможет определить такие количества на основании таких факторов как размер субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и выбранной конкретной композиции или пути введения.

Композиция должна быть стерильной и жидкой в такой степени, чтобы обеспечить доставку композиции с помощью шприца. Помимо воды носитель может представлять собой изотонический буферный солевой раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композиции изотонических агентов, например, Сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено путем

включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия или желатина.

Когда активное соединение защищено соответствующим образом, как описано выше, соединение может быть введено перорально, например, с инертным разбавителем или ассимилируемым съедобным носителем.

IV Варианты применения и способы согласно настоящему изобретению.

Антитела, молекулярные конъюгаты, биспецифические молекулы и композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения и/или предотвращения ряда заболеваний и состояний (например, иммунизации против них).

Одним из основных показаний для лечения является рак. Типы рака включают, но не ограничиваются указанными, лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, такой как миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелобластный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, первичную лимфому центральной нервной системы, лимфому Беркитта и В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, болезнь Ослера, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, остеосаркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, колоректальную карциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, карциному почек, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильма, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичек, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, немелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пениалому, гемангиобластому, неврому слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, карциному носоглотки, карциному пищевода, базальноклеточную карциному, рак желчных путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарциному, разновидности колоректального рака, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почек, рак гортани, рак печени, рак легких (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланому, нейробластому; рак полости рта (например, губы, языка, ротовой полости и глотки), рак яичников, рак поджелудочной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак прямой кишки; рак дыхательной системы, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы. Конкретные виды рака включают CD40-экспрессирующие опухоли, выбранные из группы, состоящей из хронического лимфобластного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, первичной лимфомы центральной нервной системы, лимфомы Беркитта и В-клеточной лимфомы из клеток краевой зоны.

Антитела и конъюгаты согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения бактериальных, грибковых, вирусных и паразитарных инфекционных заболеваний.

При применении в терапии антитела согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту непосредственно (т.е. в условиях *in vivo*), либо в виде монотерапии, либо с другими видами терапии, такими как иммуностимулирующий агент, вакцина, химиотерапия или лучевая терапия. Во всех случаях антитела, конъюгаты, биспецифические молекулы, композиции и иммуностимулирующие агенты и другие виды терапии вводят в эффективном количестве, чтобы осуществить желательное терапевтическое действие. Термин "эффективное количество" относится к тому количеству, которое является необходимым или достаточным для осуществления желательного биологического эффекта. Например, эффективным количеством может быть количество, необходимое для устранения опухоли, рака или бактериальной, вирусной или грибковой инфекции. Эффективное количество для любого конкретного применения может варьироваться в зависимости от таких факторов как заболевание или состояние, которое лечат, конкретное вводимое антитело, размер субъекта или степень тяжести заболевания или состояния. Специалист в данной области техники может эмпирически определить эффективное количество конкретной молекулы без излишних экспериментов.

Предпочтительные пути введения включают, например, инъекцию (например, подкожную, внутривенную, парентеральную, внутривнутрибрюшинную, интратекальную). Инъекция может быть выполнена в виде болюса или непрерывной инфузии. Другие пути введения включают пероральное введение.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело вводят в комбинации с вакцинным антигеном для усиления иммунного ответа против вакцинного антигена, такого как опухолевый антиген (усиливая тем самым иммунный ответ против опухоли) или антигена из возбудителя инфекционного заболевания (усиливая тем самым иммунный ответ против возбудителя инфекционного забо-

левания). Вакцинный антиген может представлять собой любой антиген или антигенную композицию, способную вызывать иммунный ответ против опухоли или против возбудителя инфекционного заболевания, такого как вирус, бактерия, паразит или грибок. Он также может представлять собой, например, неоантиген, такой как те, которые получают в результате секвенирования опухолей пациентов. Антиген или антигены могут представлять собой, например, пептиды/белки, полисахариды и/или липиды, или могут быть введены в виде нуклеиновых кислот (таких как ДНК), кодирующих пептидные или белковые антигены, которые могут быть экспрессированы в условиях *in vivo*. Антиген или антигены, происходящие из опухолей, такие как различные опухолевые антигены, описаны выше в настоящем документе. В другом варианте антиген или антигены могут быть получены из патогенов, таких как вирусы, бактерии, паразиты и/или грибки, такие как различные патогенные антигены, описанные выше в настоящем документе. Дополнительные примеры подходящих патогенных антигенов включают, но не ограничиваются указанными, следующие:

Вирусные антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из: цитомегаловируса (особенно цитомегаловируса человека, например, gB или его производные); вируса Эпштейна-Барр (например, gp350); флавивирусов (например, вируса желтой лихорадки, вируса денге, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита); вируса гепатита, такого как вирус гепатита В (например, поверхностный антиген гепатита В, такой как антигены PreS1, PreS2 и S, описанные в EP-A-414 374; EP-A-0304 578 и EP-A-198474), вируса гепатита А, вируса гепатита С и вируса гепатита Е; ВИЧ-1 (такие как tat, nef, gp120 или gp160); вирусов герпеса человека, такие как gD или его производные или немедленный ранний белок, такой как ICP27 из ВГЧ 1 или ВГЧ 2; вирусов папилломы человека (например, ВПЧ 6, 11, 16, 18); вируса гриппа (целый живой или инактивированный вирус, расщепленный вирус гриппа, выращенный в яйцах или клетках линии MDCK, или клетках Vero, или виросомы целого вируса (как описано Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) или их очищенные или рекомбинантные белки, такие как белки NP, NA, HA или M); вируса кори; вируса свинки; вируса парагриппа; вируса бешенства; респираторно-синцитиального вируса (например, белки F и G); ротавируса (включая живые вирусы со сниженной вирулентностью); вируса оспы; вируса ветряной оспы (например, gp1, II и IE63); и ВПЧ, ответственных за рак шейки матки (например, ранние белки E6 или E7, гибридные с белком D-носителем с образованием гибридов белок D-E6 или E7 из ВПЧ 16 или их комбинации; или комбинации E6 или E7 с L2 (см., например, WO 96/26277).

Бактериальные антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из *Bacillus* spp., включая *B. anthracis* (например, токсин ботулизма); *Bordetella* spp., включая *B. pertussis* (например, пертактин, коклюшный токсин, филаментный гемагглютинин, аденилатциклазу, фимбрии); *Bordetia* spp., включая *B. burgdorferi* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Campylobacter* spp., включая *C. jejuni* (например, токсины, адгезины и инвазины) и *C. coli*; *Chlamydia* spp., включая *C. trachomatis* (например, МОМР, связывающие гепарин белки), *C. pneumoniae* (например, МОМР, связывающие гепарин белки), *C. psittaci*; *Clostridium* spp., включая *C. tetani* (такой как столбнячный токсин), *C. botulinum* (например, токсин ботулизма), *C. difficile* (например, клостридиальные токсины А или В); *Corynebacterium* spp., включая *C. diphtheriae* (например, дифтерийный токсин); *Ehrlichia* spp., включая *E. equi* и агент гранулоцитарного эрлихиоза человека; *Rickettsia* spp., включая *R. rickettsii*; *Enterococcus* spp., включая *E. faecalis*, *E. faecium*; *Escherichia* spp., включая энтеротоксическую *E. coli* (например, факторы колонизации, термолabile токсин или их производные или термостойкий токсин), энтерогеморрагическую *E. coli*, энтеропатогенную *E. coli* (например, токсин, подобный сига-токсину); *Haemophilus* spp., включая *H. influenzae* типа В (например, PRP), нетипируемый штамм *H. influenzae*, например, OMP26, высокомолекулярные адгезины, P5, P6, белок D и липопротеин D, а также фимбрин и пептиды, полученные из фимбрина (см. пример US 5843464); *Helicobacter* spp., включая *H. pylori* (например, уреазу, каталазу, вакуолирующий токсин); *Pseudomonas* spp., включая *P. aeruginosa*; *Legionella* spp., включая *L. pneumophila*; *Leptospira* spp., включая *L. interrogans*; *Listeria* spp., включая *L. monocytogenes*; *Moraxella* spp., включая *M. catarrhalis*, также известный как *Branhamella catarrhalis* (например, высокомолекулярные и низкомолекулярные адгезины и инвазины); *Moraxella catarrhalis* (включая их наружные мембранные везикулы и OMP106 (см., например, WO97/41731)); *Mycobacterium* spp., включая *M. tuberculosis* (например, ESAT6, антиген 85A, -B или -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Neisseria* spp., включая *N. gonorrhoea* и *N. meningitidis* (например, капсулярные полисахариды и их конъюгаты, трансферринсвязывающие белки, лактоферринсвязывающие белки, PilC, адгезины); *Neisseria meningitidis* В (включая их наружные мембранные везикулы и NspA (см., например, WO 96/29412), *Salmonella* spp., включая *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *Shigella* spp., включая *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*, *Staphylococcus* spp., включая *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp., включая *S. pneumoniae* (например, капсулярные полисахариды и их конъюгаты, PsaA, PspA, стрептолизин, холинсвязывающие белки) и белковый антиген пневмолизин (*Biochem Biophys Acta*, 1989,67,1007; Rubins et al., *Microbial Pathogenesis*, 25,337-342) и их мутированные детоксифицированные производные (см., например, WO 90/06951, WO 99/03884), *Treponema* spp. включая *T. pallidum* (например, белки наружной мембраны), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Vibrio* spp., включая *V. chol-*

era (например, холерный токсин); и *Yersinia* spp., включая *Y. enterocolitica* (например, Yop-белок), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

Паразитарные/грибковые антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из: *Babesia* spp., включая *B. microti*; *Candida* spp., включая *C. albicans*, *Cryptococcus* spp., включая *C. neoformans*; *Entamoeba* spp., включая *E. histolytica*; *Giardia* spp., включая *G. lamblia*; *Leshmania* spp., включая *L. major*; *Plasmodium falciparum* (MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, секвестрин, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 и их аналоги в *Plasmodium* spp.); *Pneumocystis* spp., включая *P. carinii*; *Schistosoma* spp., включая *S. mansoni*; *Trichomonas* spp., включая *T. vaginalis*; *Toxoplasma* spp., включая *T. gondii* (например, SAG2, SAG3, Tg34); *Trypanosoma* spp., включая *T. cruzi*.

Следует понимать, что в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения антигены и антигенные детерминанты можно применять во многих различных формах. Например, антигены или антигенные детерминанты могут присутствовать в виде выделенных белков или пептидов (например, в так называемых "субъединичных вакцинах") или, например, в качестве ассоциированных с клетками или ассоциированных с вирусами антигенов или антигенных детерминант (например, как в живых патогенных штаммах, так и в мертвых патогенных штаммах). Живые патогены предпочтительно будут ослаблены известным способом. В другом варианте антигены или антигенные детерминанты могут быть получены у субъекта в условиях *in situ* с использованием полинуклеотида, кодирующего антиген или антигенную детерминанту (как при так называемой "ДНК-вакцинации"), хотя следует понимать, что полинуклеотиды, которые можно применять с таким подходом, не ограничены ДНК и также могут включать РНК и модифицированные полинуклеотиды, как обсуждалось выше.

При применении в терапии молекулярные конъюгаты (т.е. конъюгированные вакцины) согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту непосредственно (т.е. в условиях *in vivo*), либо по отдельности, либо с иммуностимулирующим агентом. Согласно одному аспекту иммуностимулирующий агент соединен с конъюгатом. В другом варианте конъюгаты могут быть введены субъекту косвенно путем приведения первого конъюгата (например, с помощью культивирования или инкубации) в контакт с АПК, такими как дендритные клетки, и затем введения клеток субъекту (т.е. в условиях *ex vivo*). Приведение в контакт и доставка конъюгатов в АПК так, что они подвергаются процессингу и представляются АПК перед введением, также называется "загрузка" антигена или клеток. Методики загрузки антигенов в АПК хорошо известны в данной области техники и включают, например, те, которые описаны в Gunzer and Grabbe, *Crit Rev Immunol* 21 (1-3):133-45 (2001) и Steinman, *Exp Hematol* 24(8):859-62 (1996).

Во всех случаях конъюгированные вакцины и иммуностимулирующие агенты вводят в количестве, эффективном для достижения желательного терапевтического действия.

Антитела, молекулярные конъюгаты, биспецифические молекулы и композиции согласно настоящему изобретению также могут быть введены совместно с адъювантами и другими терапевтическими агентами. Следует понимать, что в настоящем документе термин "совместно введенный" включает любой или все из одновременного, отдельного или последовательного способа введения антител и конъюгатов согласно настоящему изобретению с адъювантами и другими агентами, включая введение в качестве части схемы дозирования. Антитела обычно получают только в носителе или в комбинации с такими агентами. Примеры подходящих носителей включают растворы, растворители, дисперсионные среды, замедляющие агенты, эмульсии и т.п. Применение таких сред для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. В объем настоящего изобретения включен любой другой стандартный носитель, подходящий для использования с указанными молекулами.

Агенты, подходящие для совместного введения с антителами, конъюгатами, биспецифическими молекулами и композициями, включают другие антитела, цитотоксины и/или лекарственные препараты, а также адъюванты, иммуностимулирующие агенты и/или иммуносупрессорные агенты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения агент представляет собой химиотерапевтический агент. Антитела, биспецифические молекулы и композиции можно вводить в комбинации с излучением.

Химиотерапевтические агенты, подходящие для совместного введения с антителами и конъюгатами согласно настоящему изобретению при лечении опухолей, включают, например, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаиин, тетракаиин, лидокаиин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи. Дополнительные агенты включают, например, антимаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин) и темозоломид.

Агенты, которые устраняют или ингибируют виды иммуносупрессорной активности, например, иммунными клетками (например, регуляторными Т-клетками, НКТ-клетками, макрофагами, супрессор-

ными клетками миелоидного происхождения, незрелыми или супрессорными дендритными клетками) или супрессорными факторами, вырабатываемыми опухолевыми клетками или клетками-хозяевами в местное микроокружение опухоли (например, TGF- β , индоламин-2,3-диоксигеназы - IDO), также могут быть введены с антителами и конъюгатами согласно настоящему изобретению. Такие агенты включают антитела и низкомолекулярные лекарственные препараты, такие как ингибиторы IDO, такие как 1-метилтриптофан или его производные.

Агенты, подходящие для совместного введения с антителами, конъюгатами и биспецифическими молекулами согласно настоящему изобретению для индукции или усиления иммунного ответа, включают, например, адъюванты и/или иммуностимулирующие агенты, неограничивающие примеры которых были раскрыты выше. Предпочтительным иммуностимулирующим агентом является агонист TLR3, такой как поли-IC.

V. Виды комбинированной терапии.

Антитела к CD40, описанные в настоящем документе, также можно применять в комбинированной терапии, например, для лечения рака. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам комбинированной терапии, в которых антитело к CD40 вводят совместно с одним или более дополнительными агентами, например, низкомолекулярными лекарственными препаратами, антителами или их антигенсвязывающими частями и/или белковыми лигандами, которые эффективно стимулируют иммунные ответы, чтобы тем самым дополнительно усиливать, стимулировать или активировать иммунные ответы у субъекта. Более того, как показано в приведенных в настоящем документе примерах, введение агонистического антитела к CD40 и растворимого CD40-лиганда оказывает синергическое действие при индукции сигналов, опосредуемых рецепторами Т-клеток, например, о чем свидетельствует увеличение экспрессии CD95 в опухолевых клетках.

Например, антитело к CD40, например, описанное в настоящем документе, можно комбинировать с (i) агонистом стимулирующей (например, костимулирующей) молекулы (например, рецептором или лигандом) и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала или молекулы (например, рецептором или лигандом) на иммунных клетках, таких как Т-клетки, причем оба условия приводят к усилению иммунных ответов, таких как ответы антигенспецифических Т-клеток. Согласно некоторым аспектам иммуноонкологическим агентом является (i) агонист стимулирующей (включая костимулирующую) молекулы (например, рецептора или лиганда) или (ii) антагонист ингибирующей (включая коингибирующую) молекулы (например, рецептора или лиганда) на клетках, участвующих во врожденном иммунитете, например, NK-клетках, и при этом иммуноонкологический агент усиливает врожденный иммунитет. Такие иммуноонкологические агенты часто называются регуляторами контрольной точки иммунитета, например, ингибитором контрольной точки иммунитета или стимулятором контрольной точки иммунитета.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к CD40 вводят с агентом, мишенью которого является стимулирующая или ингибирующая молекула, которая является членом суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Например, антитела к CD40, например, описанные в настоящем документе, могут быть введены субъекту с агентом, мишенью которого является член семейства IgSF, для увеличения иммунного ответа. Например, антитело к CD40 может быть введено с агентом, который нацелен (или специфически связывается с ним) на член семейства B7 связанных с мембраной лигандов, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6, или костимулирующий или коингибирующий рецептор, специфично связывающийся с членом семейства B7.

Антитело к CD40 также может быть введено с агентом, мишенью которого является член семейства молекул TNF и TNFR (лиганды или рецепторы), такой как CD40 и CD40L (например, CD40 человека и CD40L человека), OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Ответы Т-клеток можно стимулировать с помощью комбинации антител к CD40, описанных в настоящем документе, например, 3C3 и 3G5, и одного или более антагонистов (ингибитора или блокирующего агента) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы контрольной точки иммунитета), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и любого из следующих белков: TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и/или одного или более агонистов белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Примерные агенты, которые модулируют один из вышеуказанных белков и могут быть комбинированы с агонистическими антителами к CD40, например, описанными в настоящем документе, для лечения рака, включают: ервой (YervoyTM) (ипилимумаб) или тремелимумаб (Tremelimumab) (против CTLA-4), галиксимаб (galiximab) (против B7.1), BMS-936558/ниволумаб (nivolumab) (против PD-1), МК-

3475/пембролизумаб (pembrolizumab) (против PD-1), AMP224 (против B7DC), BMS-936559 (против B7-H1), MPDL3280A/атезолизумаб (atezolizumab) (против B7-H1), MEDI-570 (против ICOS), AMG557 (против B7H2), MGA271 (против B7H3), IMP321 (против LAG-3), BMS-663513 (против CD137), PF-05082566 (против CD137), CDX-1127 (против CD27), анти-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (против OX40L), атацицепт (Atacicept) (против TACI), CP-870893 (против CD40), лукатумумаб (Lucatumumab) (против CD40), дацетузумаб (Dacetuzumab) (против CD40), муромонаб (Muromonab)-CD3 (против CD3), ипилимумаб (Ipilimumab) (против CTLA-4).

Другие молекулы, которые можно комбинировать с агонистическими антителами к CD40 для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на НК-клетках или агонисты активирующих рецепторов на НК-клетках. Например, агонистические антитела к CD40 можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

Активацию Т-клеток также можно регулировать с помощью растворимых цитокинов, и антитела к CD40 могут быть введены субъекту, например, имеющему рак, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела к CD40 можно применять в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими агентами) белков семейства IgSF или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, ИЛ-6, ИЛ-10, TGF- β , VEGF, "иммуносупрессорные цитокины"), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF, или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, чтобы стимулировать иммунный ответ, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как рак.

Другие агенты для разных видов комбинированной терапии включают агенты, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая, но не ограничиваясь указанными, антагонисты КСФ-1R, такие как антагонисты КСФ-1R, включая RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) или FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Антитела к CD40 также могут быть введены с агентами, которые ингибируют передачу сигналов с участием TGF- β .

Дополнительные агенты, которые можно комбинировать с антителом к CD40, включают агенты, которые усиливают презентацию опухолевых антигенов, например, вакцины на основе дендритных клеток, клеточные вакцины, секретирующие ГМ-КСФ, олигонуклеотиды CpG и имиквимод, или виды терапии, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

Другие виды терапии, которые можно комбинировать с антителом к CD40, включают виды терапии, которые истощают или блокируют регуляторные Т-клетки, например, агент, который специфически связывается с CD25.

Другой вид терапии, который можно комбинировать с антителом к CD40, представляет собой терапию, которая ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота.

Другой класс агентов, которые можно комбинировать с антителом к CD40, включает агенты, которые ингибируют образование аденозина или ингибируют рецептор аденозина A2A.

Другие виды терапии, которые можно комбинировать с антителом к CD40 для лечения рака, включают виды терапии, которые обращают/предотвращают энергию или истощение Т-клеток, и виды терапии, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в опухолевом очаге.

Антитело к CD40 можно комбинировать более чем с одним иммуноонкологическим агентом и можно применять, например, в сочетании с комбинаторным подходом, который нацелен на несколько элементов иммунного пути, таким как один или более из следующих: терапия, которая усиливает презентацию опухолевого антигена (например, вакцина на основе дендритных клеток, клеточные вакцины, секретирующие ГМ-КСФ, олигонуклеотиды CpG, имиквимод); терапия, которая ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования CTLA-4 и/или пути с участием PD1/PD-L1/PD-L2 и/или истощения или блокирования регуляторных Т-клеток или других иммуносупрессорных клеток; терапия, которая стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с использованием агонистов, которые стимулируют путь с участием CD-137, OX-40 и/или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапия, которая системно увеличивает частоту противоопухолевых Т-клеток; терапия, которая истощает или ингибирует регуляторные Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения CD25 с использованием специфичных для него гранул в условиях *ex vivo*; терапия, которая влияет на функцию супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапия, которая усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или НК-клеток, включая генетически модифицированные клетки, например, клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (терапия CAR-T); терапия, которая ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота; терапия, которая обращает/предотвращает энергию или истощение Т-клеток; терапия, которая запускает активацию врож-

денного иммунного ответа и/или воспаление в опухолевом очаге; введение иммуностимулирующих цитокинов; или блокирование иммуносупрессорных цитокинов.

Агонистические антитела к CD40, описанные в настоящем документе, можно применять вместе с одним или более агонистическими агентами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими агентами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистами, а также одним или более агентами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, агентами, которые преодолевают различные иммунные подавляющие пути в микроокружении опухоли (например, блокируют вовлечение ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют регуляторные Т-клетки (например, с использованием моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения CD25 с использованием специфичных для него гранул), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают энергию или истощение Т-клеток), и агентами, которые запускают активацию врожденного иммунного ответа и/или воспаление в опухолевых очагах.

Настоящее изобретение относится к способам стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающим введение субъекту агонистической молекулы против CD40, например, антитела, и одного или более дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист PD-1, например, антагонистическое антитело, антагонист PD-L1, например, антагонистическое антитело, антагонист CTLA-4, например, антагонистическое антитело и/или антагонист LAG3, например, антагонистическое антитело, так, что у субъекта стимулируется иммунный ответ, например, для того чтобы ингибировать рост опухоли или стимулировать противовирусный ответ. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дополнительным иммуностимулирующим антителом (например, антагонистическим антителом к PD-1, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к CTLA-4 и/или антагонистическим антителом к LAG3) является антитело человека.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающим введение субъекту агонистического антитела к CD40 и антагонистического антитела к PD-1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, и антитело к CD40 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области из 3С3 и 3G5, описанных в настоящем документе, или другое агонистическое антитело к CD40, описанное в настоящем документе.

Подходящие антагонисты PD-1 для применения в способах, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются указанными, лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифические антитела) и поливалентные агенты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антагонист PD-1 представляет собой гибридный белок, например, гибридный белок Fc, такой как AMP-244. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1.

Примерное антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или переменные области одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в WO 2006/121168. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело к PD1 представляет собой МК-3475 (ламбролизумаб), описанный в WO 02012/145493; и AMP-514, описанный в WO 2012/145493. Другие известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают те, которые описаны в WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и публикации патента США № 2009/0317368. Также можно применять любые антитела к PD-1, описанные в WO 2013/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, как и одно из указанных антител, также можно применять в комбинированных способах лечения. Другим подходом к нацеливанию на рецептор PD-1 является рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), гибридного с частью Fc IgG1, называемый AMP-224.

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающим введение субъекту агонистического антитела к CD40 и антагонистического антитела PD-L1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, и антитело к CD40 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области из 3С3 и 3G5, описанных в настоящем документе, или другое агонистическое антитело к CD40, описанное в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (называемое 12A4 в WO 2007/005874 и патенте США № 7943743), или антитело, которое содержит CDR или переменные области из 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в PCT публикации WO 07/005874 и в патенте США № 7943743. В определенном варианте реализации антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как анти-B7-H1),

MPDL3280A (также известное как RG7446), MSB0010718C (WO2013/79174) или gHigM12B7. Также можно применять любые антитела к PD-L1, описанные в WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и публикации US 2009/145493. Антитела к PD-L1, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, как и любое из указанных антител, также можно применять в комбинированных способах лечения.

Настоящее изобретение относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающим введение субъекту антитела к CD40, описанного в настоящем документе, и антагонистического антитела к CTLA-4. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы, включающей: ервой™ (ипилимумаб или антитело 10D1, описанное в PCT публикации WO 01/14424), тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675206), моноклональное антитело или антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): реферат 2505 (антитело CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Также можно применять любые антитела к CTLA-4, описанные в WO2013/173223.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака), включающим введение субъекту антитела к CD40 и антитела к LAG-3. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъект является человеком. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, и антитело к CD40 представляет собой моноклональное антитело, содержащее последовательность антитела человека, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области из 3C3 или 3G5, описанных в настоящем документе, или другое агонистическое антитело к CD40, описанное в настоящем документе. Примеры антител к LAG3 включают антитела, содержащие CDR или переменные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в публикации патента США US2011/0150892, WO10/19570 и WO2014/008218. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие общеизвестные в данной области техники антитела к LAG-3, которые можно применять, включают IMP731 и IMP-321, описанные в US 2011/007023, WO08/132601 и WO09/44273. Антитела к LAG-3, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, как и любое из указанных антител, также можно применять в комбинированных способах лечения.

Введение антител к CD40, описанных в настоящем документе, и антагонистов, например, антагонистических антител, к одному или более целевым антигенам, таким как LAG-3 и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усилить иммунный ответ на раковые клетки у пациента. Виды рака, рост которых можно ингибировать с использованием антител согласно настоящему изобретению, включают виды рака, обычно отвечающие на иммунотерапию, и те, которые обычно не отвечают на иммунотерапию. Типичные примеры видов рака для лечения с применением комбинированной терапии согласно настоящему изобретению включают те виды рака, которые перечислены в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинация терапевтических антител, обсуждаемых в настоящем документе, может быть введена одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, в которых каждое антитело находится в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения комбинация терапевтических антител может быть введена последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и антитело к CD40 можно вводить последовательно, например, сначала вводят антитело к CTLA-4 и затем вводят антитело к CD40, или сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к CTLA-4. Дополнительно или в другом варианте антитело к PD-1 и антитело к CD40 можно вводить последовательно, например, сначала вводят антитело к PD-1 и затем вводят антитело к CD40, или сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к PD-1. Дополнительно или в другом варианте антитело к PD-L1 и антитело к CD40 можно вводить последовательно, например, сначала вводят антитело к PD-L1 и затем вводят антитело к CD40 или сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к PD-L1. Дополнительно или в другом варианте антитело к LAG-3 и антитело к CD40 можно вводить последовательно, например, сначала вводят антитело к LAG-3 и затем вводят антитело к CD40 или сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к LAG-3.

Помимо этого, если последовательно вводят более одной дозы комбинированной терапии, то порядок последовательного введения может быть обращен или сохранен без изменения в каждой временной точке введения, последовательные введения можно комбинировать с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и антитела к CD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к CTLA-4 и затем вводят антитело к CD40, и третье введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к CTLA-4 и т.д. Дополнительно или в другом варианте первое введение комбинации антитела к PD-1 и антитела к CD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к PD-1 и затем вводят антитело

к CD40, и третье введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к PD-1 и т.д. Дополнительно или в другом варианте первое введение комбинации антитела к PD-L1 и антитела к CD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к PD-L1 и затем вводят антитело к CD40, и третье введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к CD40, затем вводят антитело к PD-L1 и т.д. Дополнительно или в другом варианте первое введение комбинации антитела к LAG-3 и антитела к CD40 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к LAG-3 и затем вводят антитело к CD40, и третье введение может быть последовательным, при этом сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к LAG-3 и т.д. Другая типичная схема дозирования может включать первое введение, которое является последовательным, при этом сначала вводят антитело к CD40 и затем вводят антитело к CTLA-4 (и/или антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3), и последующие введения могут быть одновременными.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое антитело CD137. Подходящие антитела к CD137 включают, например, урелумаб или PF-05082566 (WO12/32433).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой агонист OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают, например, MEDI-6383, MEDI-6469 или MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой второй агонист CD40, такой как другое агонистическое антитело к CD40.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают, например, варлилумаб (CDX-1127).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой MGA271 (против B7H3) (WO11/109400).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой антагонист KIR, такой как лирилумаб.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают, например, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) или F001287.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40 и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, например, агонист TLR2/4 (например, бациллу Кальмета-Герена); агонист TLR7 (например, хилтонол или имиквимод); агонист TLR7/8 (например, резиквимод); или агонист TLR9 (например, CpG7909).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта, имеющего заболевание, на которое можно оказать благоприятное воздействие в результате стимуляции иммунной системы, например, рак или инфекционное заболевание, лечат путем введения указанному субъекту антитела к CD40

и иммуноонкологического агента, причем иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор TGF- β , например, GC1008, LY2157299, TEW7197 или IMC-TR1.

Согласно одному аспекту антитело к CD40 последовательно вводят перед введением второго агента, например, иммуноонкологического агента. Согласно одному аспекту антитело к CD40 вводят одновременно со вторым агентом, например, с иммуноонкологическим агентом. Согласно другому аспекту антитело к CD40 последовательно вводят после введения второго агента. Введение двух агентов можно начинать во временных точках, которые разделены между собой интервалом времени, составляющим, например, 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 5 дней, 7 дней или одну или более недель, или введение второго агента можно начинать через, например, 30 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 3 дня, 5 дней, 7 дней или одну или более недель после введения первого агента.

Согласно некоторым аспектам антитело к CD40 и второй агент, например, иммуноонкологический агент, вводят одновременно, например, вводят пациенту одновременно в течение периода, составляющего, например, 30 или 60 минут. В другом варианте антитело к CD40 может быть получено совместно со вторым агентом, например, иммуноонкологическим агентом.

Необязательно антитело к CD40 вводят в качестве единственного иммунотерапевтического агента, или в комбинации с антителом к CD40, и одно или более дополнительных иммунотерапевтических антител (например, антитело к CTLA-4 и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3) можно дополнительно комбинировать с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые можно применять, включают пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина ГМ-КСФ (более подробно обсуждается ниже). Антитело к CD40 и одно или более дополнительных антител (например, антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3), также могут быть дополнительно комбинированы со стандартными способами лечения рака. Например, антитело к CD40 и одно или более дополнительных антител (например, антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях можно снизить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему изобретению (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация агонистического антитела к CD40 (с дополнительным антителом, таким как антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1 и/или антитела к LAG-3 или без них) в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером является комбинация антитела к CD40 (с антителами к CTLA-4 и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3 или без них) в комбинации с интерлейкином-2 (ИЛ-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения антитела к CD40 и антител к CTLA-4 и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3 с химиотерапией заключается в том, что гибель клетки, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличению уровней опухолевого антигена в пути презентации антигена. Другие виды комбинированной терапии, которые могут обеспечить синергическое действие с антителом к CD40 (с антителом к CTLA-4 и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3 или без них), включают радиационную терапию, хирургическое вмешательство или гормональное истощение. Каждый из указанных протоколов создает в организме хозяина источник опухолевого антигена. Ингибиторы ангиогенеза также можно применять в сочетании с комбинацией антитела к CD40 и антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которая может быть источником опухолевого антигена, введенного в пути презентации антигена в организме хозяина.

Агонистическое антитело к CD40 в качестве единственного иммунотерапевтического агента или комбинацию агонистов CD40 и блокирующих антител к CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 также можно применять в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают эффекторные клетки, экспрессирующие рецептор Fc α или Fc γ , на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Этапы этих реакций, опосредуемые Т-клетками, будут усилены за счет применения комбинации антитела к CD40 и антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3.

В другом примере агонистическое антитело к CD40 в качестве единственного иммунотерапевтического агента или комбинация антитела к CD40 и дополнительного иммуностимулирующего агента, например, антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или агента против LAG-3, например, антитела, может быть использована совместно с антинеопластическим антителом, таким как

ритуксан (Rituxan®) (ритуксимаб), герцептин (Herceptin®) (трастузумаб), бексар (Bexxar®) (тозитумомаб), зевалин (Zevalin®) (ибритумомаб), кампат (Campath®) (алемтузумаб), лимфоцид (Lymphocide®) (например, эпртузумаб), авастин (Avastin®) (бевацизумаб) и тарцева (Tarceva®) (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера и безотносительно к какой-либо теории, авторы настоящего изобретения полагают, что лечение с применением противоракового антитела или противоракового антитела, конъюгированного с токсином, может привести к гибели раковых клеток (например, опухолевых клеток), что может усилить иммунный ответ, опосредуемый иммуностимулирующим агентом, например, агентом против CD40, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например, антителом. В примерном варианте реализации настоящего изобретения лечение гиперпролиферативного заболевания (например, раковой опухоли) может включать противораковый агент, например, антитело, в комбинации с антителом к CD40 и необязательно дополнительным иммуностимулирующим агентом, например, агентом против CTLA-4 и/или агентом против PD-1, и/или агентом против PD-L1, и/или агентом против LAG-3, например, антителом, при этом введение можно осуществлять одновременно или последовательно, или с помощью любой комбинации указанных типов введения, которые могут усилить противоопухолевые иммунные ответы в организме хозяина.

Опухоли уклоняются от иммунного надзора хозяина с помощью большого количества механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммуносупрессорными. Такие белки включают, в частности, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), ИЛ-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13:198-200), и лиганд Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274:1363-1365). Антитела к каждой из указанных молекул можно дополнительно комбинировать с антителом к CD40 с дополнительным иммуностимулирующим агентом или без него, например, агентом против CTLA-4 и/или агентом против PD-1, и/или агентом против PD-L1, и/или агентом против LAG-3, таким как антитело, чтобы противодействовать эффектам иммуносупрессорных агентов и способствовать развитию противоопухолевого иммунного ответа в организме хозяина.

Другие агенты, например, антитела, которые можно применять для активации восприимчивости иммунной системы хозяина, также можно применять в комбинации с антителом к CD40 с дополнительным иммуностимулирующим агентом или без него, таким как антитело к CTLA-4 и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию ДК и презентацию антигена. Антитела к CD40 (Ridge et al., выше) можно применять в комбинации с антителом к CD40 и необязательно дополнительным иммуностимулирующим агентом, например, агентом против CTLA-4 и/или агентом против PD-1, и/или агентом против PD-L1, и/или агентом против LAG-3, например, антителом. Другие активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток (Weinberg et al., выше, Melero et al., выше, Hutloff et al., выше) также могут обеспечить повышенные уровни активации Т-клеток.

Как обсуждалось выше, трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Для повышения эффективности пересаженных донорских опухолеспецифических Т-клеток можно применять иммунотерапию антителами к CD40 по отдельности или в комбинации с антителом к CTLA-4 и/или антителом к PD-1, и/или антителом к PD-L1, и/или антителом к LAG-3.

Несколько экспериментальных протоколов лечения включают активацию в условиях *ex vivo* и размножение антигенспецифических Т-клеток и адаптивный перенос указанных клеток реципиентам для того чтобы обеспечить антигенспецифичные Т-клетки, направленные против опухоли (Greenberg & Riddell, выше). Указанные способы также можно применять для активации ответов Т-клеток на инфекционные агенты, такие как ЦМВ. Как ожидается, активация в условиях *ex vivo* в присутствии антитела к CD40 с дополнительной иммуностимулирующей терапией или без нее, например, антителами к CTLA-4 и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1 и/или антителами к LAG-3, увеличит частоту и активность адаптивно перенесенных Т-клеток.

Настоящее изобретение относится к способам изменения нежелательного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, рака), с применением иммуностимулирующего агента, включающим введение субъекту антитела к CD40 в комбинации с агентом против CTLA-4 и/или агентом против PD-1, и/или агентом против PD-L1 и/или агентом против LAG-3, например, антителом, или без указанных агентов. Например, способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают способ снижения частоты колита или диареи, индуцированных иммуностимулирующим терапевтическим антителом, путем введения пациенту невсасывающегося стероида. В настоящем документе термин "невсасывающийся стероид" представляет собой глюкокортикоид, для которого характерен интенсивный пресистемный метаболизм, так, что после метаболического превращения в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. менее приблизительно 20%. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, описанному в настоящем документе, невсасывающимся стероидом является будесонид. Будесонид представляет собой глюкокортикостероид местного действия, который интенсивно метаболизируется, в основном печенью, после перорального введения. Энтокорт ЕС (ENTOCORT EC®) (Asstra-Zeneca) представляет собой состав для перорального введения с высвобождением, которое контроли-

руется рН среды и зависит от времени, разработанный для оптимизации доставки лекарственного препарата в подвздошную кишку и на всем протяжении толстой кишки. Энтокорт ЕС® одобрен в США для лечения болезни Крона легкой и умеренной степени тяжести с вовлечением подвздошной кишки и/или восходящей ободочной кишки. Обычная пероральная доза энтокорта ЕС® для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/сутки. Энтокорт ЕС® высвобождается в кишечнике до момента всасывания и удержания в слизистой оболочке кишечника. После прохождения через слизистую оболочку кишечника, которая является целевой тканью, энтокорт ЕС® интенсивно метаболизируется в печени системой цитохрома P450, при этом его метаболиты обладают незначительной глюкокортикоидной активностью. Следовательно, его биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит к улучшенному терапевтическому соотношению по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее интенсивным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит к возникновению меньшего количества нежелательных явлений, включая менее выраженную супрессию гипоталамо-гипофизарной оси, по сравнению с кортикостероидами системного действия. Тем не менее, хроническое введение энтокорта ЕС® может приводить к системным эффектам глюкокортикоидов, таким как гиперкортицизм и подавление функции надпочечников. См. PDR 58thed. 2004; 608-610.

Согласно более подробным вариантам реализации настоящего изобретения антитело к CD40 совместно с иммуностимулирующими терапевтическими антителами к CD40 или без них и необязательно антителами к CTLA-4 и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3, в комбинации с невоссасываемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают агенты 5-ASA, такие как, например, сульфасалазин (азульфидин (AZULFIDINE®), Pharmacia & UpJohn); олсалазин (olsalazine) (дипентум (DIPENTUM®), Pharmacia & UpJohn); балсалазид (колазал (COLAZAL®), Salix Pharmaceuticals, Inc.); и мезаламин (азакол (ASACOL®), Procter & Gamble Pharmaceuticals, пентаса (PENTASA®), Shire US, канаса (CANASA®), Axcan Scandipharm, Inc, роваса (ROWASA®), Solvay).

В соответствии со способами, описанными в настоящем документе, салицилат вводят в комбинации с антителом к CD40, совместно с антителами к CTLA-4 и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1 и/или антителами к LAG-3 или без них, и невоссасываемым стероидом, чтобы снизить частоту возникновения колита, индуцированного иммуностимулирующими антителами. Соответственно, например, способы снижения частоты колита, индуцированного иммуностимулирующими антителами, описанными в настоящем документе, включают введение салицилата и невоссасываемого стероида одновременно или последовательно (например, салицилат вводят через 6 часов после введения невоссасываемого стероида) или в любой их комбинации. Помимо этого салицилат и невоссасываемый стероид можно вводить с помощью одного и того же пути введения (например, оба вводят перорально) или с помощью различных путей (например, салицилат вводят перорально, а невоссасываемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути (путей), используемого для введения антитела к CD40 и антител к CTLA-4 и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3.

Антитела к CD40 и способы комбинированной терапии на основе антител, описанные в настоящем документе, также можно применять в комбинации с другими хорошо известными способами лечения, которые выбраны на основании их особой полезности для показания, которое лечат (например, рака). Комбинации антител к CD40, описанные в настоящем документе, можно применять последовательно с известным фармацевтически приемлемым агентом (агентами).

Например, антитела к CD40 и способы комбинированной терапии на основе антител, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации (например, одновременно или по отдельности) с дополнительным способом лечения, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина-паклитаксела (таксола), доксорубицина, 5-фторурацила или камптотецина+аро21/TRAIL (6X combo)), одним или более ингибиторами протеасом (например, бортезомибом или MG132), одним или более ингибиторами Bcl-2 (например, BH3I-2 (ингибитор bcl-xl), ингибитором индоламиндиоксигеназы-1 (например, INCB24360, индоксимодом, NLG-919 или F001287) AT-101 (производное R-(-)-госсиопола), АВТ-263 (небольшая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или антагонистами MCL-1 (белок дифференцировки клеток миелобластного лейкоза-1)), антагонистами iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярными миметиками smac, синтетическими smac-пептидами (см. Fulda et al., Nat Med 2002; 8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторами HDAC (гистондеацетилазы), антителами к CD20 (например, ритуксимабом), ингибиторами ангиогенеза (например, бевацизумабом), антиангиогенными агентами, нацеленными на VEGF и VEGFR (например, авастинном), синтетическими тритерпеноидами (см. Huer et al., Cancer Research 2005; 65:4799-808), модуляторами с-FLIP (клеточный белок, ингибирующий FLICE) (например, природными и синтетическими лигандами PPAR γ / (γ -рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторами киназ (например, сорафенибом), трастузумабом, цетуксимабом, темсиролимусом, ингибиторами mTOR, такими как рапамицин и темсиролимус, бортезомибом, ингибиторами JAK2, ингибиторами HSP90, ингибиторами PI3K-AKT, ленилалдомидом, ингиби-

торами GSK3P, ингибиторами IAP и/или генотоксическими лекарственными препаратами.

Антитела к CD40 и способы комбинированной терапии на основе антител, описанные в настоящем документе, также можно применять в комбинации с одним или более антипролиферативными цитотоксическими агентами. Классы соединений, которые можно применять в качестве антипролиферативных цитотоксических агентов, включают, но не ограничиваются указанными, следующие:

Алкилирующие агенты (включая, но не ограничиваясь указанными, азотистые иприты, производные этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (цитоксанTM), фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфоамин, бусульфид, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включая, но не ограничиваясь указанными, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пуринов и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабина фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные агенты для комбинирования с агонистическими антителами к CD40 включают, но не ограничиваются указанными, таксан, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как таксолTM), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксипотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]-дегидродезоксипотилоны В, С12,13-циклопропилэпотилон А, С6-С8 мостиковый эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон В10, дискодермолид, патупилон (ЕРО-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-ЕРО, АВJ-789, ХАА296А (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), PLX-651 (тазидотин гидрохлорид), галихондрин В, эрибулина мезилат (Е-7389), гемиастерлин (НТИ-286), Е-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтансиноидов (DM-1), МКС-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, МК-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострептин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки агентам, известным в данной области техники.

В тех случаях, когда необходимо перевести aberrантно пролиферативные клетки в покоящее состояние в сочетании с лечением антителами к CD40, описанными в настоящем документе, или до начала такого лечения, гормоны и стероиды (включая синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстильбэстрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, пропионат дромостанолон, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклоротетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, золадексTM, также могут быть введены пациенту. При применении способов или композиций, описанных в настоящем документе, другие агенты, используемые для модуляции роста или метастазирования опухоли в клинических условиях, такие как антимиметики, также могут быть введены при необходимости.

Специалистам в данной области техники известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических агентов. Помимо этого их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в Physicians' Desk Reference (PDR), e.g., 1996 изд. (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Химиотерапевтический агент (агенты) и/или лучевая терапия могут быть введены в соответствии с терапевтическими протоколами, хорошо известными в данной области техники. Специалисты в данной области техники поймут, что введение химиотерапевтического агента (агентов) и/или лучевой терапии может быть изменено в зависимости от заболевания, которое лечат, и известных эффектов химиотерапевтического агента(ов) и/или лучевой терапии на данное заболевание. Помимо этого в соответствии с навыками квалифицированного врача, терапевтические протоколы (например, количество доз и время введения) могут варьироваться в зависимости от наблюдаемого действия вводимых терапевтических агентов на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические агенты.

VI. Результаты.

Как показано в примерах в настоящем документе, совместное введение антитела к CD40 с одним или более дополнительными терапевтическими агентами (например, растворимым CD40-лигандом или другим антителом, таким как антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CTLA-4 и/или антитело к LAG-3) обеспечивает улучшенную эффективность, по сравнению с лечением антителом по отдельности или одним или более дополнительными терапевтическими агентами в отсутствие терапии антителом. Предпочтительно комбинация антитела к CD40 с одним или более дополнительными терапевтическими агентами проявляет терапевтическое синергическое действие.

"Терапевтическое синергическое действие" относится к феномену, при котором лечение пациентов с применением комбинации терапевтических агентов проявляет терапевтически более благоприятный результат, по сравнению с результатом, который достигается при применении каждого отдельного ком-

понента комбинации в оптимальной дозе (Т. Н. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187). В данном случае терапевтически более благоприятным результатом является тот, при котором пациенты либо а) имеют более низкую частоту нежелательных явлений, при этом получая терапевтическую пользу, которая аналогична или превышает пользу у пациентов, которым отдельные компоненты комбинации вводят в виде монотерапии в той же дозе, в которой они входят в состав комбинации, или б) не имеют ограничивающей дозу токсичности, получая терапевтическую пользу, которая аналогична или превышает пользу у пациентов, которые получают каждый отдельный компонент комбинации, причем каждый отдельный компонент вводят в тех же дозах, в которых они входят в состав комбинации (комбинаций), при их введении в виде индивидуальных компонентов. В ксенотрансплантатных моделях комбинация, используемая в максимально переносимой дозе, в которой каждый из отдельных компонентов будет присутствовать в дозе, которая обычно не превышает индивидуальную максимально переносимую дозу для данного компонента, проявляет терапевтическое синергическое действие, когда, например, достигается уменьшение роста опухоли при введении комбинации, которое по величине превышает уменьшение роста опухоли, вызываемое самым эффективным компонентом, при введении данного компонента в виде монотерапии.

Следовательно, в комбинации компоненты таких комбинаций обладают аддитивным или сверхаддитивным действием на подавление роста опухоли, по сравнению с монотерапией антителом к CD40 или лечением дополнительным терапевтическим агентом (агентами) в отсутствие терапии антителом. Под термином "аддитивный" понимают результат, который превышает по степени (например, по степени уменьшения митотического индекса опухоли или роста опухоли или степени сжатия опухоли или частоты и/или продолжительности периодов без проявления симптомов или с меньшим количеством симптомов) лучший отдельный результат, достигаемый при применении каждого отдельного компонента в виде монотерапии, тогда как термин "сверхаддитивный" используется, чтобы указать на результат, который превышает по степени сумму таких отдельных результатов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аддитивный эффект измеряется как замедление или остановка роста опухоли. Аддитивный эффект также может быть измерен, например, как уменьшение размера опухоли, уменьшение митотического индекса опухоли, уменьшение количества метастатических поражений с течением времени, увеличение общей частоты ответов или увеличение медианы выживаемости или общей выживаемости. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения аддитивный эффект измеряется как увеличение индукции экспрессии CD95 при инкубации с клетками линии Ramos, увеличение пролиферации В-клеток, инкубированных с В-клетками человека, и/или увеличение повышенной индукции экспрессии ИЛ-12p40 при инкубации с дендритными клетками.

Одним из неограничивающих примеров меры, с помощью которой можно количественно оценить эффективность терапевтического лечения, является вычисление \log_{10} гибели клеток, который определяется в соответствии со следующим уравнением

$$\log_{10} \text{гибели клеток} = TC \text{ (дни)} / 3,32 \times Td$$

в котором TC представляет собой задержку размножения клеток, выраженную как среднее время в днях, необходимое для того чтобы опухоли в получившей лечение группе (Т) и опухоли в контрольной группе (С) достигли заранее определенного значения (1 г, или 10 мл, например), и Td представляет собой период времени в днях, необходимый для удвоения объема опухоли у контрольных животных. При применении этой меры продукт считается активным, если \log_{10} гибели клеток превышает или равен 0,7, и продукт считается очень активным, если \log_{10} гибели клеток превышает 2,8. При применении этой меры комбинация, используемая в ее максимальной переносимой дозе, в которой каждый из компонентов присутствует в дозе, которая обычно меньше или равна его максимальной переносимой дозе, проявляет терапевтическое синергическое действие, если значение \log_{10} гибели клеток превышает значение \log_{10} гибели клеток для самого эффективного отдельного компонента при его введении в виде монотерапии. В примерном случае значение \log_{10} гибели клеток комбинации превышает значение \log_{10} гибели клеток наиболее эффективного отдельного компонента по меньшей мере на 0,1 \log гибели клеток, по меньшей мере на 0,5 \log гибели клеток или по меньшей мере на 1,0 \log гибели клеток.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью нижеследующих примеров, которые не должны быть истолкованы как дополнительное ограничение. Содержание Перечня последовательностей, фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, приведенных в тексте настоящей заявки, явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры.

Пример 1.

Получение CD40-специфических моноклональных антител человека.

CD40-специфические моноклональные антитела человека получали путем иммунизации трансгенных мышей линии H2L2 Harbour® растворимым антигеном CD40 человека. Трансгенные мыши Harbour® имели устроенные последовательности ДНК тяжелой цепи (HC) и легкой каппа-цепи (κ-цепи) и имели стабильно встроенные в их геном последовательности вариабельных (V) областей человека и константных (C) областей крысы.

Антиген и иммунизация: антиген представлял собой растворимый гибридный белок, содержащий внеклеточный домен CD40, гибридный с доменом Fc антитела (R&D Systems), или рекомбинантный химерный белок CD40 человека-msG2a (полученный как собственная разработка). Антиген смешивали с полным адъювантом Фрейнда (Sigma) для первой иммунизации. После этого антиген смешивали с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma). Дополнительных мышей иммунизировали растворимым белком CD40 в MPL с адъювантной системой TDM (Sigma). По 5-25 мкг растворимого рекомбинантного антигена CD40 в ФСБ или 5×10^6 клеток линии NSO, трансфицированных для поверхностной экспрессии CD40 человека, в ФСБ смешивали с адъювантом в соотношении 1:1. Мышам вводили 200 мкл готового антигена путем инъекции в перитонеальную полость каждые 14 дней. Животные, у которых вырабатывались антитела к CD40, получали 5-10 микрограмм растворимого рекомбинантного антигена CD40 путем внутривенной инъекции за три-четыре дня до слияния. Селезенки мышей собирали, и выделенные спленоциты использовали для получения гибридомы.

Получение гибридомы: для слияний использовали линию клеток миеломы мышей P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Для культивирования клеток миеломы использовали RPMI 1640 (Invitrogen), содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Дополнительные вспомогательные вещества для среды добавляли в ростовую среду для гибридомы, которая содержала: вплоть до 10% добавки, способствующей росту гибридомы (Sigma), 10% ФБС (Sigma), L-глутамин (Gibco) 0,1% гентамицин (Gibco), 2-меркаптоэтанол (Gibco) с НАТ (Sigma, $1,0 \times 10^{-4}$ М гипоксантина, $4,0 \times 10^{-7}$ М аминоптерина, $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидиновых сред).

Клетки селезенки смешивали с клетками миеломы P3x63Ag8.653 в соотношении 6:1 и осаждали путем центрифугирования. Полиэтиленгликоль добавляли по каплям и осторожно перемешивали, чтобы облегчить слияние. Гибридомы выращивали в течение одной-двух недель до появления видимых колоний. Супернатант собирали и использовали для первоначального скрининга для определения IgG крысы с помощью ИФА с использованием растворимого гибридного белка CD40 человека и специфического детектирования Fc крысы. IgG-положительные супернатанты затем количественно исследовали для определения специфичности в отношении CD40 с помощью проточной цитометрии. Гибридомы также подвергали скринингу для выявления перекрестной реактивности с CD40 яванских макаков, при этом все гибридомы были положительными в отношении связывания.

Клетки гибридомы размножали, и клеточную массу замораживали для выделения и секвенирования РНК. Области, кодирующие V_H и V_L , моноклональных антител человека идентифицировали с использованием РНК из соответствующих гибридом. РНК подвергали обратной транскрипции с получением кДНК, V -кодирующие области амплифицировали с помощью ПНР, и продукт ПНР секвенировали, вставляли в вектор, экспрессирующий IgG2 человека, кратковременно экспрессировали и очищали с помощью колоночной хроматографии на носителе протеине А, что позволило выделить ряд антител, представляющих особый интерес, которые были обозначены как 3С3, 3G5, 1В4, 3В6, 6Н6, 6Н6, 2Е1.2, 1В5-НК (в последнем случае после модификации N75K на FR3 тяжелой цепи) и 3В6-NS (после модификации N63S на FR3 легкой цепи антитела 3В6 для удаления сайта N-гликозилирования).

В табл. 1, 2 и 3 обобщена информация о зародышевой линии и аминокислотных последовательностях областей V_H и V_L МАТ человека (в случае аминокислотных последовательностей выделены гипервариабельные участки (CDR)). Соответствующие последовательности нуклеиновых кислот приведены в таблице последовательностей, озаглавленной "Сводный обзор перечня последовательностей", в конце данных примеров.

Таблица 1. Данные по зародышевой линии

MAT	VH/VL	Зародышевая линия		
		V	D	J
3G5	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ5*01 F (JK5)
3C3	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*02 F (D4-b)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ3*01 F (JK3)
3B6	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
6H6	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
1B4	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD1-26*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
1B5-NK	H	IGHV3-33*03 F (VH3-33)	IGHD6-19*01 F (D2-15)	IGHJ2*01 F (JH2)
	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ2*01 F (JK2)
2 E1.2	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4B)
	L2	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
3B6-NS	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L2	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)

Таблица 2. Последовательности CDR

MAT	VH/VL	CDR согласно Кабат (Чотия)					
		CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO
3G5	H	SNGIH (GFTFSSN)	5, 6	VIWSDGSNKFYAD SVKG (WSDGSN)	7, 8	ASGSGSYYNFF DY (ASGSGSYYNFF DY)	9, 10
	L	RASQSVRSN LA (RASQSVRSN LA)	11, 12	GASTRAT (GASTRAT)	13, 14	QQHNKWIT (QQHNKWIT)	15, 16
3C3	H	RYGMY (GFIFSR)	19, 20	VIWYDGSYKYA DSVKG (WYDGSY)	21, 22	ESPWYFDY (ESPWYFDY)	23, 24
	L	RASQGISNYL A (RASQGISNY LA)	25, 26	AATLQS (AATLQS)	27, 28	QKYKSAPFT (QKYKSAPFT)	29, 30
3B6	H	SYAMS (GFTFSSY)	33, 34	GITGTGGSTYYAD SVKG (TGTGGS)	35, 36	RAGGSFYYYG MDV (RAGGSFYYYG GMDV)	37, 38
	L	RSSQSLHST GYNYLD (RSSQSLHST TGNYLD)	39, 40	LGSNRAS (LGSNRAS)	41, 42	MQUALQTPWT (MQUALQTPWT)	43, 44
6H6	H	SYGMH (GFTLSSY)	47, 48	VIWDDGSNKYYA DSVKG (WDDGSN)	49, 50	AGSSGRYYNY DY (AGSSGRYYNY FDY)	51, 52
	L	RASQSVRSN LA (RASQSVRSN LA)	53, 54	GASTRAT (GASTRAT)	55, 56	QQHNNWLT (QQHNNWLT)	57, 58
1B4	H	SYAMT (GFTFSSY)	61, 62	GITGSGANTFYTD SVKG (TGSGAN)	63, 64	RNGGSYYYYG MDV (RNGGSYYYYG GMDV)	65, 66
	L	RSSQSLHSS GYNYLD (RSSQSLHSS SGNYLD)	67, 68	LGSNRAS (LGSNRAS)	69, 70	MQUALQIPWT (MQUALQIPWT)	71, 72
1B5- NK	H	SFGMH (GFTFSSF)	103, 104	LIWFDGSSKYYA DSVKG (WFDGSS)	105, 106	GFAAVAGWYF DF (GFAAVAGWY FDF)	107, 108
	L	RASQVRYL A (RASQVRYL KYLA)	109, 110	AATLQS (AATLQS)	111, 112	QKYFSAPYT (QKYFSAPYT)	113, 114
2E1.2	H	SYGMH (GFTFSSY)	89, 90	VIWDDGSNKYY ADSVKG (WDDGSN)	91, 92	AGSSGRYYNY FDY (AGSSGRYYNY FDY)	93, 94
	L	RASQSVRS NLA (RASQSVRS NLA)	95, 96	GASTRAT (GASTRAT)	97, 98	QQYNKWLI (QQYNKWLI)	99, 100
3B6- NS	H	SYAMS (GFTFSSY)	75, 76	GITGTGGSTYYAD SVKG (TGTGGS)	77, 78	RAGGSFYYYG MDV (RAGGSFYYYG GMDV)	79, 80
	L	RSSQSLHST GYNYLD (RSSQSLHST TGNYLD)	81, 82	LGSNRAS (LGSNRAS)	83, 84	MQUALQTPWT (MQUALQTPWT)	85, 86

Таблица 3. Полноразмерные последовательности переменных областей

MAT	VH/VL	SEQ ID NO	Последовательность
3G5	H	3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS NGIH WVRQAPGKGL EWVA VIWSDGSKNFYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR ASGSGSYNFFDY WGQGLVTVSS
	L	4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVRSNLA WYQQKPGQAPR LLIY GASTRAT GIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYC QOII NKWITFGQGRLEIK
3C3	H	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIF RYGMY WVRQAPGKGL LEWVA VIWYDGSYKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCARE SPWYFFDY WGQGLVTVSS
	L	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQGISNYLA WYQQKPGKVPK LLIY AASTLOS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKY KSAPFTFGPGTKVDIK
3B6	H	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS SYAMS WVRQAPGKGL EWV SGITGTGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYVQMNSLRAE DTAVYYCAK RAGGSFY YGGMDVWGQGTITVTVSS
	L	32	DIVMTQSPSLPVTPEPASPIS RSSQSLHSTGYNYLD WYLQKPG QSPQLLIY LGSNRAS GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVYY CMQALQTPWTF GHGKVEIK
6H6	H	45	QVQLVESGGGVVQPGRSLRFSCAASGFTL SSYGMH WVRQAPGKGL LEWVA VIWDDGSKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCAR AGGSGRYNYFDY WGQGLVTVSS
	L	46	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVRSNLA WYQQKPGQAPR LLIY GASTRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC QOHN NWLT FGGKVEIK
1B4	H	59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS SYAMT WVRQVPGKGL EWV SGITGSGANTFYTDSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAD DTAVYYCAK RNGGSYYYGGMDV WGQGTITVTVSS
	L	60	DIVMTQSPSLPVTPEPASPIS RSSQSLHSSGYNYLD WYLQKPG QSPQLLIY LGSNRAS GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQALQTPWTF GHGKVEIK
1B5-NK	H	101	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS SFGMH WVRQAPGKGL LEWVA TLIWFDDGSKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCVR GFAAVAGWYDFD WGRGTLVTVSS
	L	102	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQVVRKYLA WYQQKPGKVP KLLIY AASTLOS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QK YFSAPYTFGQGT KLEIK
2E1.2	H	87	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS SYGMH WVRQAPGKGL LEWVA VIWDDGSKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCAR AGGSGRYNYFDY WGQGLVTVSS
	L	88	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVRSNLA WYQQKPGQAPR LLIY GASTRAT GIPDRFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYHC QOYN KWLIFGGG KVEIK
3B6-NS	H	73	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS SYAMS WVRQAPGKGL EWV SGITGTGGSTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYVQMNSLRAE DTAVYYCAK RAGGSFY YGGMDVWGQGTITVTVSS
	L	74	DIVMTQSPSLPVTPEPASPIS RSSQSLHSTGYNYLD WYLQKPG QSPQLLIY LGSNRAS GVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVYY CMQALQTPWTF GHGKVEIK

Полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей антитела 3C3 были следующими.

Последовательность легкой цепи (с удаленной лидерной последовательностью) (SEQ ID NO: 136)

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLOS*GVPSR

FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT

LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Последовательность тяжелой цепи (с удаленной лидерной последовательностью) (SEQ ID NO: 135)

*QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRYGMVWVRQAPGKGLEWVAITWYDGSYKYYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPWYFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHSTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVCEPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

В каждом случае варибельная последовательность выделена курсивным шрифтом, и константный домен выделен жирным шрифтом. Последовательность константного домена представляет собой последовательность IgG2, из которой были удалены С-концевые лизины.

Идентичную последовательность константного домена использовали для других антител с их соответствующими варибельными последовательностями, как указано выше.

Пример 2.

Определение аффинности и кинетических констант МАТ человека с помощью интерферометрии биослоев (BLI).

Аффинность связывания и кинетику связывания различных антител к CD40 человека исследовали с помощью интерферометрии биослоев (BLI) с использованием прибора Octet™ QK° (Pall ForteBio, Менло Парк, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Очищенные антитела из примера 1 захватывали на биосенсоры Anti-Human Fc Capture (АНС) (ForteBio, каталожный номер 18-5060). Каждое антитело готовили в буфере для разведения (10 mM PO4+150 mM NaCl+1 мг/мл БСА+0,5% Твин 20, pH 7,2) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл и загружали на заново гидрированные биосенсоры АНС в течение 35-50 с при 25°C и скорости встряхивания планшетов 1000 об./мин, чтобы достичь целевого отклика 0,2 нм. Низкие уровни лиганда захватывали, чтобы ограничить любые эффекты массопереноса аналита на кинетические параметры. Для проведения одного количественного исследования восемь биосенсоров загружали одним и тем же антителом.

Связывание определяли, подвергая шесть из биосенсоров, загруженных антителами, воздействию аналита: растворимого CD40 человека-MsIgG2a (Celldex, 60 кДа согласно данным гель-электрофореза в ДСН-ПААГ). Параметры аффинности определяли с использованием 2-кратных серийных разведений аналита в диапазоне от 3,13 до 0,098 нМ в буфере для разбавления при 25°C и скорости встряхивания планшета 1000 об./мин. Ассоциацию загруженных антителами биосенсоров с аналитом в лунках проводили в течение 1200 секунд, затем биосенсоры помещали в лунки с буфером для разбавления на 2,5 ч (9000 с) для оценки параметров диссоциации.

Соответствующие контроли проводили в каждом случае, сохраняя два оставшихся биосенсора с захваченным антителом в лунках с буфером для разбавления для стадий ассоциации и диссоциации. Данные для контрольных биосенсоров использовали для вычитания неспецифического сигнала, а также учета дрейфа биосенсора и диссоциации антител от биосенсоров.

Для получения кинетических параметров связывания с захваченным антителом из серии концентраций аналита в буфере для разбавления в каждом случае использовали программное обеспечение для анализа данных ForteBio's, версия 8.2.0.7 (Pall ForteBio, Менло Парк, Калифорния, США). Кривые ассоциации и диссоциации аппроксимировали с использованием модели связывания в соотношении 1:1 с помощью программного обеспечения для анализа данных в соответствии с рекомендациями производителя.

Определенные параметры аффинности и кинетики (после вычитания неспецифического сигнала) представлены на фиг. 1, где k_{on} =константа скорости ассоциации, k_{dis} =константа скорости диссоциации, и K_D =равновесная константа диссоциации/связывания, определяемая соотношением k_{dis}/k_{on} .

Пример 3.

Количественные исследования для определения характеристик связывания МАТ человека с CD40.

Планшеты для микротитрования покрывали рекомбинантным CD40 человека-Fc в ФСБ и затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в ФСБ. МАТ человека после очистки на протеине А из примера 1 и контроль изотипа добавляли в различных концентрациях и инкубировали при 37°C. Планшеты промывали с использованием ФСБ/твин и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ) поликлональным козьим реагентом, специфическим в отношении F(ab')₂ IgG человека, при 37°C. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с использованием субстрата ПХ и анализировали при OD450-650 с использованием считывателя для планшетов для микротитрования. Типичные кривые связывания приведены на фиг. 2.

Чтобы установить, являются ли яванские макаки подходящей моделью для испытания МАТ к CD40, очищенные МКПК макаки или МКПК человека инкубировали с различными концентрациями МАТ к CD40 человека в течение 20 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Затем клетки дважды промывали с использованием ФСБ, содержащего 0,1% БСА и 0,05% Na₂S₂O₃ (ФСБ-А). За-

тем вносили козье антитело к Fc IgG человека, конъюгированное с фикоэритрином (ФЭ), и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов. В-клетки выявляли путем последующего окрашивания с использованием антитела к CD20, конъюгированного с аллофикоцианином (АФЦ). Клетки исследовали методом проточной цитометрии, и кривые связывания представлены на фиг. 3, которые свидетельствуют об аналогичном связывании с CD40 от макаки и человека.

Пример 4.

Исследование блокирования связывания sCD40L методом ИФА.

Действие МАТ человека из примера 1 на связывание растворимого CD40-лиганда (sCD40L) с белком CD40 измеряли методом ИФА. Планшет для микротитрования покрывали с использованием 2 мкг/мл химерного белка растворимого рекомбинантного CD40 человека и области Fc, доступного от R&D Systems, затем блокировали с использованием 5% ФСБ-А. Антитела к CD40 ([конечная концентрация]=100 мкг/мл) добавляли в планшет и затем вносили растворимый рекомбинантный CD40L человека-биотин, доступный от Immupex ([конечная концентрация]=0,5 мкг/мл). CD40-захваченный rCD40L детектировали с использованием стрептавидин-ПХ и субстрата Super Blue TMB. Результаты представлены на фиг. 4А и В совместно с данными контрольных образцов, как указано.

Пример 5.

Связывание с CD40-экспрессирующими клетками.

Способность МАТ человека к CD40 связываться с CD40 на клетках, экспрессирующих CD40 человека на своей поверхности, исследовали методом проточной цитометрии, как описано далее.

Исследовали связывание антител из примера 1 с линиями клеток человека, экспрессирующих CD40 человека на своей поверхности. МАТ человека, очищенные с помощью протеина А, 3С3, 3Г5, 1В4, 3В6 и 6Н6, инкубировали с клетками линий Raji и Ramos, экспрессирующими CD40 человека, при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Через 20 минут клетки промывали с использованием ФСБ, содержащего 0,1% БСА и 0,05% NaN₃ (ФСБ-А), и связанные антитела детектировали путем инкубации клеток с меченым фикоэритрином антителом-зондом козы, специфическим в отношении Fc IgG человека. Избыточное антитело-зонд отмывали с клеток с использованием ФСБ-А, и интенсивность флуоресценции, связанной с клеткой, определяли с использованием прибора FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в соответствии с указаниями производителя.

Как показано на фиг. 5 (связывание с клетками линии Raji) и фиг. 6 (связывание с клетками линии Ramos), МАТ человека продемонстрировали высокие уровни связывания с клетками, экспрессирующими CD40 человека, которые зависели от концентрации антител.

Пример 6.

Индукция CD95 на клетках линии Ramos.

Клетки линии Ramos инкубировали в течение ночи при 37°C, 6% CO₂ с 2 мкг/мл МАТ человека к CD40 из примера 1. На следующий день клетки промывали один раз с использованием ФСБ-А и окрашивали с использованием конъюгированного с фикоэритрином антитела к CD95 (Becton Dickinson) в течение 20 минут при комнатной температуре со встряхиванием. Избыточное меченое антитело отмывали, и показатели образцов считывали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). Как показано на фиг. 7А и В ((на которых заштрихованные графики представляют необработанные/контрольные клетки, и черные линии представляют клетки, обработанные антителами, как указано), антитела 3С3 и 1В5-НК вызывали увеличение экспрессии CD95, и другие антитела 3Г5, 1В4, 3В6, 6Н6, 2Е1.2 и 3В6-NS были способны индуцировать сильное увеличение поверхностной экспрессии CD95.

Пример 7.

Активация дендритных клеток.

Дендритные клетки получали из моноцитов человека следующим образом.

МКПК добавляли в колбы T175 см² и инкубировали для адгезии моноцитов в течение ~2 часов при 37°C, 6% CO₂. Клетки удаляли, и моноциты культивировали в течение 7 дней в RPMI, содержащей 10% ФБС, 10 нг/мл ИЛ-4 (R&D Systems) и 100 нг/мл ГМ-КСФ (R&D Systems). Клетки собирали, и их идентичность дендритным клеткам подтверждали на основании экспрессии CD11c (данные не представлены).

Затем клетки инкубировали в присутствии 10 мкг/мл антител 3С3 и 3Г5 к CD40 человека из примера 1 и соответствующих контролей при 37°C, 6% CO₂. Через 72 часа клетки собирали, и супернатант собирали и хранили для исследования цитокинов. Клетки окрашивали следующими мечеными антителами в течение 20 минут при комнатной температуре при встряхивании: HLA-DR V450, CD54-ФЭ, CD86-АФЦ и CD83 BV510 (все от BD). Клетки затем дважды промывали и исследовали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На фиг. 8А представлен уровень экспрессии для каждого из перечисленных маркеров при инкубации с указанным антителом или контролем.

Индукцию ИЛ-12p40 оценивали в супернатантах из указанных 72-часовых культур методом ИФА (R&D Systems). На фиг. 9 показано увеличение выработки ИЛ-12p40 под действием антител 3С3 и 3Г5 к CD40 по отношению к контролям, как указано.

В другом эксперименте клетки инкубировали в присутствии 10, 1 и 0,1 мкг/мл антител 3С3 и 3Г5 к CD40 человека из примера 1 и соответствующих контролей при 37°C, 6% CO₂. Через 48 часов клетки

собирали, и супернатант собирали и хранили для исследования цитокинов. Клетки окрашивали с использованием меченого антитела к CD54 (BD) в течение 20 минут при комнатной температуре при встряхивании. Клетки затем дважды промывали и исследовали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На фиг. 8B представлен уровень экспрессии CD54 при инкубации с указанным антителом или контролем.

Индукцию ИЛ-12p40 оценивали в супернатантах из указанных 48-часовых культур методом ИФА (R&D Systems). На фиг. 9B показано увеличение выработки ИЛ-12p40 под действием антител 3C3 и 3G5 к CD40 относительно контролей, как указано.

Пример 8.

Активация В-клеток.

Цельную кровь инкубировали с 10 мкг/мл антител 3C3 и 3G5 к CD40 из примера 1 в течение ночи при 37°C, 6% CO₂. На следующий день для окрашивания В-клеток и маркеров активации использовали следующие меченые антитела: CD54-ФЭ, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69-АФЦ, CD86-АФЦ, CD38 PerCP-Cy5.5 и CD71-ФЭ. Клетки окрашивали в течение 20 минут при комнатной температуре и встряхивании, затем дважды промывали и параметры считывали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На фиг. 10A показано изменение уровня экспрессии для каждого из указанных маркеров относительно контролей, как указано.

В другом эксперименте цельную кровь инкубировали с 10, 1 и 0,1 мкг/мл антител к CD40, 3C3 и 3G5, из примера 1 в течение ночи при 37°C, 6% CO₂. На следующий день для окрашивания В-клеток и маркеров активации использовали следующие меченые антитела: CD19 V500, HLA-DR V450, CD86-АФЦ (все от BD). Клетки окрашивали в течение 20 минут при комнатной температуре и встряхивании, затем дважды промывали и параметры считывали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На фиг. 10B показано изменение уровня экспрессии для каждого из указанных маркеров относительно контролей, как указано.

Пример 9.

Активация NFκB.

Клеточную линию, несущую репортер люциферазу, экспрессирующую CD40, инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 6% CO₂ с различными концентрациями антител к CD40 человека из примера 1. Экспрессию люциферазы детектировали с помощью системы для количественного исследования люциферазы от Promega в соответствии с рекомендациями производителя. На фиг. 11A и 11B показан высокий уровень активации NFκB, индуцированный антителами 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK и 3B6-NS, в зависимости от концентрации антител.

Пример 10.

Уничтожение опухоли в ксенотрансплантатной опухолевой модели на мышах SCID, несущих клетки линии Raji.

Мышей линии CB.17 SCID (приобретенных у Taconic Biosciences, Inc.) содержали в стерильных условиях в виварии для мышей. Лимфомные клетки линии Raji (1×10^6) вводили подкожно мышам линии SCID, по 5 мышей на группу. На 1, 5 и 11 день указанным мышам вводили клон МАТ человека к CD40, 3C3 и 3G5, путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 0,3 мг. Рост опухоли измеряли с помощью штангенциркулей 2 раза в неделю. Результаты оценки роста опухоли и анализа выживаемости представлены на фиг. 12, на которой можно видеть, что у мышей, зараженных опухолевыми клетками, лечение с применением антител к CD40 ингибирует рост опухолей и значительно продлевает выживаемость по сравнению с контролями, получавшими физиологический раствор.

Пример 11.

Уничтожение опухоли в ксенотрансплантатной опухолевой модели на мышах SCID, несущих клетки линии Ramos.

Мышей линии CB.17 SCID (приобретенных у Taconic Biosciences, Inc.) содержали в стерильных условиях в виварии для мышей. Клетки лимфомы человека линии Ramos (1×10^6) вводили подкожно мышам линии SCID на 0 день, по 5 мышей на группу. На 1, 5 и 11 день указанным мышам вводили МАТ человека к CD40, 3C3 или 3G5, путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 0,3 мг. Рост опухоли измеряли с помощью штангенциркулей 2 раза в неделю.

Результаты, представленные на фиг. 13, указывают на то, что МАТ к CD40 значительно ингибировали увеличение объема опухоли по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор, что привело к выживанию 100% (3G5) или 80% (3C3) мышей, зараженных опухолевыми клетками.

Пример 12.

Пролиферация Т-клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК), выделенные из препаратов лейкоцитарной пленки, помечали с использованием 0,5 мкМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) при комнатной температуре при вращении в течение 5 минут. CFSE-меченые МКПК ($1,5 \times 10^6$) распределяли в лунки, покрытые сухим способом антителом к CD3 (ОКТ3) в концентрации 0,2 мкг/мл.

Антитела к CD40 (3G5, 3C3, 1412) или антитело для контроля изотипа (IgG2) распределяли в лунки в растворимой форме в конечной концентрации 10 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 37°C (5% CO₂). На 6 день клетки собирали и окрашивали с использованием АФЦ-конъюгированного антитела к CD3 или контроля изотипа и исследовали методом проточной цитометрии. Типичные графики представлены на фиг. 14А, из которой следует, что антитела значительно усиливали пролиферацию Т-клеток, о чем свидетельствует сниженная интенсивность окрашивания CFSE в гейте CD3⁺. Результаты повторного эксперимента представлены на фиг. 14В, которые свидетельствуют об увеличении количества делящихся клеток под действием антител к CD40, по сравнению с антителом для контроля изотипа.

Пример 13.

Связывание с CD40, не зависящее от взаимодействия с рецептором Fc.

Планшеты для микротитрования покрывали рекомбинантным CD40 человека-Fc в ФСБ и затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в ФСБ. МАТ человека, очищенные на протеине А (полный IgG и фрагменты F(ab')₂, как указано) добавляли в различных концентрациях и инкубировали при 37°C. Планшеты промывали с использованием ФСБ/твин и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена поликлональным козьим реагентом, специфическим в отношении F(ab')₂ IgG человека, при 37°C. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ПХ и исследовали при OD450-650 с использованием считывателя для планшетов для микротитрования. Результаты представлены на фиг. 15. Варианты IgG2 и варианты F(ab')₂ каждого антитела проявляли сходную концентрационную зависимость связывания с CD40-Fc.

Пример 14.

Активация CD40, не зависящая от взаимодействия с рецептором Fc.

Клеточную линию, несущую репортер люциферазу, экспрессирующую CD40, из примера 9, инкубировали в течение 6 часов при 37°C, 6% CO₂ с различными концентрациями антител человека к CD40 (как с полным IgG, так и с фрагментами F(ab')₂, как указано). Экспрессию люциферазы детектировали с помощью системы количественного исследования люциферазы от Promega в соответствии с рекомендациями производителя. Результаты представлены на фиг. 16. Полученные результаты свидетельствуют о том, что связывание с рецептором Fc не требуется для опосредуемой CD40 активации репортерной клеточной линии антителами 3C3 и 3G5, поскольку как интактные антитела с доменами Fc, так и соответствующие им варианты F(ab')₂, не содержащие домены Fc, были способны активировать NFκB в репортерной клеточной линии.

Пример 15.

Индукция CD95, не зависящая от взаимодействия с рецептором Fc.

Клетки линии Ramos инкубировали в течение ночи при 37°C, 6% CO₂ с различными концентрациями МАТ человека к CD40 (как с полным IgG, так и с фрагментами F(ab')₂, как указано). На следующий день клетки промывали один раз с использованием ФСБ-А и окрашивали ФЭ-конъюгированным антителом к CD95 (Becton Dickinson) в течение 20 минут при комнатной температуре при встряхивании. Избыточное меченое антитело отмывали, и параметры образцов считывали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). Результаты представлены на фиг. 17. Полученные данные указывают на то, что взаимодействие с рецептором Fc не требуется для индукции антителом 3G5 экспрессии CD95 на CD40⁺ линии лимфобластных клеток человека Ramos.

Пример 16.

Синергическое действие с sCD40L.

Клетки линии Ramos инкубировали в течение ночи с антителом 3C3 с добавлением 0,1 мг/мл растворимого CD40-лиганда или без него. Затем клетки окрашивали ФЭ-конъюгированным антителом к CD95 и исследовали методом проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 19 и свидетельствуют о том, что антитело к CD40 3C3 действует синергически с sCD40L. Соответственно, антитело 3C3 (и антитела к CD40, которые связываются с тем же эпитопом, как и 3C3) проявляет синергическое агонистическое действие с растворимым лигандом CD40 (sCD40L) и, следовательно, обладает способностью синергически взаимодействовать с другими терапевтическими агентами, включая те, которые связываются с сайтом связывания лиганда CD40 человека. Типичные синергические эффекты включают, например, повышение активности иммунной системы (например, опосредуемые Т-клетками иммунные ответы, как при вакцинотерапии, активация NK-клеток при разных видах терапии рака), ингибирование размножения клеток (например, при терапии рака) и/или усиленный процессинг и презентацию антигена АПК (например, при вакцинной терапии).

Пример 17.

Картирование эпитопа антител к CD40 человека, 3C3 и 3G5, и sCD40.

i) Получение усеченных и мутированных фрагментов растворимого CD40 (sCD40).

кДНК растворимого CD40 (sCD40), кодирующую полноразмерный внеклеточный домен (ВКД), охватывающий остатки аминокислот 1-173 (SEQ ID NO: 133), а также три меньших фрагмента, кодирующих аминокислоты 1-94, 36-130 и 84-173, синтезировали в компании GenScript и вставляли с сохранением открытой рамки считывания в вектор экспрессии млекопитающих с N-концевой легкой каппа-цепью и C-концевой меткой Flag. Полученные гибридные белки каппа-sCD40-Flag экспрессировали с помощью

кратковременной трансфекции в клетки ExpiCHO-S (SAFC). Поскольку антитело к CD40, 3С3, распознает CD40 человека и обезьяны, но не CD40 мыши, ряд мутированных кДНК sCD40aa 1-94 конструировали на основании различий между последовательностями человека и мыши, как показано на схемах выравнивания последовательностей на фиг. 20 и 21. Мутированные варианты синтезировали и клонировали в компании GenScript. Все указанные усеченные или мутированные фрагменты клонировали в один и тот же вектор и экспрессировали в той же клеточной линии, как и упомянутая выше.

ii) Определение связывания методом ИФА.

Связывание 3С3 с серией фрагментов sCD40 испытывали методом ИФА. По 1 мкг/мл очищенных гибридных белков каппа-sCD40-Flag или супернатантов клеток CHO, содержащих гибридные белки sCD40, захватывали на планшетах для микротитрования, которые предварительно покрывали с использованием 5 мкг/мл мышинового антитела к FLAG (Sigma) в ФСБ и блокировали с использованием 5% бычьего сывороточного альбумина в ФСБ. После инкубации с антителом к CD40 планшеты для микротитрования промывали с использованием ФСБ/твин и инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена поликлональным козьим реагентом, специфичным в отношении Fc IgG человека. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ПХ и исследовали при OD450-650 с использованием считывателя для планшетов для микротитрования. ИФА с использованием конъюгированного с ПХ козьего антитела к Fab2 IgG человека для измерения связывания каппа-цепи проводили параллельно, чтобы проверить экспрессию гибридного белка sCD40 в образцах из разных трансфекций.

Исследования методом ИФА с применением ~1 мкг/мл полноразмерного sCD40 и трех усеченных фрагментов позволили определить, что N-концевые остатки sCD40 1-94 имеют существенное значение и достаточны для связывания с 3С3, поскольку фрагмент, кодирующий остатки аминокислот 1-94, связывался с 3С3, также как и полноразмерный ВКД, но фрагменты, кодирующие остатки аминокислот 36-130 или 84-173 данной последовательности, не связывались в какой-либо степени (см. табл. 4).

Таблица 4

Остатки аминокислот фрагмента	Среднее значение OD	
	3С3	αFab2HRP
1-173	1,264	1,264
1-94	1,803	1,720
36-130	0,024	1,695
84-173	0,024	1,669
Мутированный фрагмент аминокислот 1-94		
A (1-5)	0,189	1,718
B (13-15)	2,032	1,730
C (25, 26, 28, 30)	1,487	1,685
D (33-36)	0,092	1,631

На основании полученных результатов установили, что крайне важные сайты распознавания для 3С3 находятся в пределах аминокислот 1-35.

Чтобы дополнительно идентифицировать области и остатки аминокислот, крайне важные для конформационной организации сайта связывания 3С3, по ~2 мкг/мл 13 мутированных фрагментов sCD40 (остатки аминокислот 1-94) (4 региональные множественные мутации и 9 одиночных мутаций) испытывали методом ИФА (см. табл. 5 и 6, в которых представлены результаты отдельных экспериментов, и фиг. 22).

Таблица 5

Остатки аминокислот фрагмента	Среднее значение OD	
	3С3	αFab2HRP
1-94	2,157	1,473
Мутированный фрагмент аминокислот 1-94		
A (1-5)	0,167	1,489
D (33-36)	0,124	1,429
Точечная мутация		
E1G	1,965	1,487
P2Q	2,077	1,490
P3S	2,011	1,489
T4V	2,152	1,519
A5T	1,126	1,517
E33A	1,620	1,521
F34L	1,883	1,500
T35E	2,072	1,487
E36K	1,369	1,433
PBA	0,031	0,011

Таблица 6

Остатки аминокислот фрагмента	Среднее значение OD		
	3С3	3G5	αFab2HRP
Полноразмерный фрагмент 1-173	2,364	2,214	1,525
1-94	2,151	2,170	1,755
36-130	0,029	0,048	1,716
84-173	0,024	0,038	1,599
Мутированный фрагмент аминокислот 1-94			
A (1-5)	0,250	2,139	1,699
B (13-15)	2,375	1,876	1,710
C (25, 26, 28, 30)	2,016	2,161	1,604
D (33-36)	0,233	0,042	1,548
Точечная мутация			
E1G	2,011	2,083	1,720
P2Q	2,197	2,158	1,754
P3S	2,012	2,188	1,712
T4V	2,213	2,210	1,664
A5T	1,511	2,201	1,698
E33A	1,695	0,074	1,709
F34L	1,845	1,192	1,686
T35E	2,102	2,128	1,682
E36K	1,689	1,930	1,674
<0,25			
0,25<x<1,2			
1,2<x<1,9			

Множественные мутации остатков 1-5 почти полностью предотвращали связывание с 3С3. Точечные мутации остатков 1-4 не уменьшали связывание с 3С3. Точечная мутация остатка 5 существенно уменьшала связывание, но не до той степени, которую наблюдали при множественных мутациях белка.

Множественные мутации остатков 13-15 не уменьшали связывание с 3С3. Множественные мутации остатков 25, 26, 28 и 30 вызвали незначительное уменьшение связывания с 3С3. Точечные мутации в данных областях не испытывали.

Множественные мутации остатков 33-36 почти полностью предотвращали связывание с 3С3. Точечная мутация остатка 35 не влияла на связывание. Точечные мутации 33, 34 и 36 уменьшали связывание с 3С3, но не до той степени, которую наблюдали при множественных мутациях белка. Испытывали связывание альтернативного антитела к CD40, 3G5, со всеми фрагментами и мутированными вариантами, и было показано, что оно отличается от связывания 3С3 (табл. 6). Множественные мутации остатков 1-5 не уменьшали связывание, тогда как мутация остатков 33-36 устраняла связывание. В отличие от 3С3 точечная мутация остатка 33 полностью устраняла связывание, и мутация 34 значительно уменьшала связывание.

Пример 18.

Биологический профиль и профиль токсичности.

Экспериментальное исследование, проведенное не в рамках НЛП, выполняли на наивных яванских макаках. Данное исследование было разработано для предоставления предварительных данных о биологическом профиле и профиле токсичности 3С3. Также оценивали альтернативное антитело к CD40 (3G5). Испытываемые продукты вводили путем внутривенной инъекции в подкожную вену в 1 день (0,2 мг/кг или носитель) и снова на 29 день (2 мг/кг или носитель). Животные также получали подкожную (1 мг) инъекцию гемоцианина лимфы улитки (KLH) на 1 и 29 день. Оценки потенциальных эффектов, связанных с испытываемым продуктом, были основаны на клинических признаках, температуре тела, параметрах лабораторной диагностики (гематологический анализ, коагулограмма, биохимический анализ крови и анализ мочи), присутствии антител к лекарственному препарату, уровнях цитокинов, зависимом от Т-клеток ответе на антитело (TDAR), показателях проточной цитометрии и токсикокинетических параметрах. Массу тела регистрировали один раз перед испытанием препарата и еженедельно после этого. Данное исследование было разработано как исследование выживаемости без запланированного вскрытия.

В данном исследовании введение 3С3 или 3G5 хорошо переносилось у яванских макак, при этом ни один из параметров токсичности значительно не превышал контрольные уровни. Следует отметить незначительные повышения активности аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и креатининкиназы у обезьян, которым вводили 3С3 (фиг. 23А-23С). Фармакологическое снижение уровня ИЛ-12 (фиг. 24), лейкоцитов (фиг. 25А), нейтрофилов (фиг. 25В) и лимфоцитов (фиг. 25С) наблюдали у обоих животных, получавших антитело к CD40, причем наиболее значимым было кратковременное снижение количества В-клеток (фиг. 26 и 27). В заключение следует отметить, что в условиях данного исследования 3С3 и 3G5 проявили минимальные свидетельства токсичности.

Пример 19.

Пролиферация В-клеток, не зависящая от взаимодействия с рецептором Fc.

В-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови путем магнитного отбора с использованием гранул, специфичных в отношении CD19. Клетки метили с использованием 0,5 мкМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) при комнатной температуре и вращении в течение 5 минут. Меченые клетки культивировали в присутствии МАТ к CD40, 3С3, или антитела для контроля изотипа (обоих полного IgG и фрагмента F(ab')₂) в течение 6 дней. Затем клетки собирали и исследовали методом проточной цитометрии для оценки пролиферации. Результаты представлены на фиг. 28 и свидетельствуют о том, что связывание с рецептором Fc не требуется для CD40-опосредуемой пролиферации под действием 3С3, поскольку интактные антитела с доменами Fc и соответствующие им варианты F(ab')₂, не содержащие домены Fc, были способны индуцировать пролиферацию В-клеток.

Пример 20.

Синергическое действие с CD40L в В-клетках человека.

В-клетки человека выделяли и помечали, как описано в примере 19. МАТ к CD40, 3С3, или контроль изотипа в концентрации 0,1 мкг/мл инкубировали с клетками в течение 6 дней в присутствии 0,1 мкг/мл растворимого CD40L (Immunex) или без него. На фиг. 29 показано, что при применении 3С3 по отдельности или антитела для контроля изотипа в комбинации с CD40L не наблюдали значительную пролиферацию, однако комбинация CD40L и 3С3 индуцировала пролиферацию в культуре.

Дендритные клетки получали и культивировали с 0,5 мкг/мл 3С3, как описано в примере 7, с добавлением 0,1 мкг/мл растворимого CD40L или без него. Выработку ИЛ-12p40 измеряли методом ИФА (R&D Systems). На фиг. 30 показано, что, по сравнению с низким уровнем выработки, который был индуцирован при применении только 3С3 или антитела для контроля изотипа с CD40L, комбинация 3С3 и CD40L индуцировала более высокие уровни ИЛ-12p40.

Пример 21.

Цитокиновый ответ в цельной крови.

Цельную кровь инкубировали в течение ночи с 10 мкг/мл антитела для контроля изотипа или 3С3 или ЛПС в качестве положительного контроля. На следующий день плазму крови собирали и измеряли цитокины методом ИФА (R&D Systems). Результаты представлены на фиг. 31 и свидетельствуют об отсутствии существенной выработки воспалительных цитокинов.

Эквиваленты.

Специалисты в данной области техники будут осведомлены или смогут установить с использованием обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов реализации настоящего изобре-

тения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

Сводный обзор перечня последовательностей

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ
1	<p>CD40 человека (номер доступа в GenBank: P25942)</p> <p>MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVSD CTEFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESC V LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCQPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKARHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ</p>
2	<p>CD40L человека (номер доступа в GenBank: NP_000065)</p> <p>MIETYNQTSR RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRLL DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK</p>
3	<p>3G5 – VH</p> <p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWSGDS NKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYW GQGTLVTVSS</p>
4	<p>3G5 – VL</p> <p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQHKNWITFGQGRLEIK</p>
5	<p>3G5 – VH CDR1 (КАБАТ)</p> <p>SNGIH</p>
6	<p>3G5 – VH CDR1 (ЧОТИА)</p> <p>GFTFSSN</p>
7	<p>3G5 – VH CDR2 (КАБАТ)</p> <p>VIWSDGSNKFYADSVKG</p>

8	3G5 – VH CDR2 (ЧОТИА) WSDGSN
9	3G5 – VH CDR3 (КАБАТ) ASGSGSYNFFDY
10	3G5 – VH CDR3 (ЧОТИА) ASGSGSYNFFDY
11	3G5 – VL CDR1 (КАБАТ) RASQSVRSNLA
12	3G5 – VL CDR1 (ЧОТИА) RASQSVRSNLA
13	3G5 – VL CDR2 (КАБАТ) GASTRAT
14	3G5 – VL CDR2 (ЧОТИА) GASTRAT
15	3G5 – VL CDR3 (КАБАТ) QQHNKWIT
16	3G5 – VL CDR3 (ЧОТИА) QQHNKWIT
17	3C3 – VH QQQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SYKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPWYYFDYWGQ GTLVTVSS
18	3C3 - VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGV PSRFGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVDIK
19	3C3 – VH CDR1 (КАБАТ) RYGMY
20	3C3 – VH CDR1 (ЧОТИА) GFIFSRY
21	3C3 – VH CDR2 (КАБАТ) VIWYDGSYKYYADSVKG

22	3C3 – VH CDR2 (ЧОТИА) WYDGSY
23	3C3 – VH CDR3 (КАБАТ) ESPWYYFDY
24	3C3 – VH CDR3 (ЧОТИА) ESPWYYFDY
25	3C3 – VL CDR1 (КАБАТ) RASQGISNYLA
26	3C3 – VL CDR1 (ЧОТИА) RASQGISNYLA
27	3C3 – VL CDR2 (КАБАТ) AASTLQS
28	3C3 – VL CDR2 (ЧОТИА) AASTLQS
29	3C3 – VL CDR3 (КАБАТ) QKYKSAPFT
30	3C3 – VL CDR3 (ЧОТИА) QKYKSAPFT
31	3B6 – VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGTGG STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAGGSFYYYGMD VWGQGTITVTVSS
32	3B6 – VL DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSTGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR ASGVPRDFNGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYYCMQALQTPWTFGHGTKVEIK
33	3B6 – VH CDR1 (КАБАТ) SYAMS
34	3B6 – VH CDR1 (ЧОТИА) GFTFSSY
35	3B6 – VH CDR2 (КАБАТ) GITGTGGSTYYADSVKG

36	3B6 – VH CDR2 (ЧОТИА) TGTGGS
37	3B6 – VH CDR3 (КАБАТ) RAGGSFYYYYGMDV
38	3B6 – VH CDR3 (ЧОТИА) RAGGSFYYYYGMDV
39	3B6 – VL CDR1 (КАБАТ) RSSQSLHSTGYNYLD
40	3B6 – VL CDR1 (ЧОТИА) RSSQSLHSTGYNYLD
41	3B6 – VL CDR2 (КАБАТ) LGSNRAS
42	3B6 – VL CDR2 (ЧОТИА) LGSNRAS
43	3B6 – VL CDR3 (КАБАТ) MQALQTPWT
44	3B6 – VL CDR3 (ЧОТИА) MQALQTPWT
45	6H6 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRFSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDG SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGGSGRYNYFD YWGQGLTVTVSS
46	6H6 - VL EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLIYGASTRATGI PARFSGSGGTDFLTITISLQSEDFAVYYCQQHNNWLTFGGGTKVEIK
47	6H6 – VH CDR1 (КАБАТ) SYGMH
48	6H6 – VH CDR1 (ЧОТИА) GFTLSSY
49	6H6 – VH CDR2 (КАБАТ) VIWDDGSNKYYADSVKG

50	6H6 – VH CDR2 (ЧОТИА) WDDGSN
51	6H6 – VH CDR3 (КАБАТ) AGGSGRYNYFDY
52	6H6 – VH CDR3 (ЧОТИА) AGGSGRYNYFDY
53	6H6 – VL CDR1 (КАБАТ) RASQSVRSNLA
54	6H6 – VL CDR1 (ЧОТИА) RASQSVRSNLA
55	6H6 – VL CDR2 (КАБАТ) GASTRAT
56	6H6 – VL CDR2 (ЧОТИА) GASTRAT
57	6H6 – VL CDR3 (КАБАТ) QQHNNWLT
58	6H6 – VL CDR3 (ЧОТИА) QQHNNWLT
59	1B4 - VH EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQVPGKLEWVSGITGSGA NTFYTDSVKGRFTISRDNNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAKRNGGSYYYYYGM VWGQGTITVTVSS
60	1B4 - VL DIVMTQSPLSLPVTPEPASPISCRSSQSLHSSGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNR ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPWTFGQGTKVEIK
61	1B4 – VH CDR1 (КАБАТ) SYAMT
62	1B4 – VH CDR1 (ЧОТИА) GFTFSSY
63	1B4 – VH CDR2 (КАБАТ) GITGSGANTFYTDSVKG

64	1B4 – VH CDR2 (ЧОТИА) TGSGAN
65	1B4 – VH CDR3 (КАБАТ) RNGGSYYYYYGMDV
66	1B4 – VH CDR3 (ЧОТИА) RNGGSYYYYYGMDV
67	1B4 – VL CDR1 (КАБАТ) RSSQSLHSSGYNLYD
68	1B4 – VL CDR1 (ЧОТИА) RSSQSLHSSGYNLYD
69	1B4 – VL CDR2 (КАБАТ) LGSNRAS
70	1B4 – VL CDR2 (ЧОТИА) LGSNRAS
71	1B4 – VL CDR3 (КАБАТ) MQALQIPWT
72	1B4 – VL CDR3 (ЧОТИА) MQALQIPWT
73	3B6-NS – VH EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGTGG STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAGGSFYGGYGGMD VWGQGTITVTVSS
74	3B6-NS – VL DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSTGYNLYDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR ASGVPRDFSGSGSDFTLKISRVEAEDFQVYVCMQALQTPWTFGHGKVEIK
75	3B6-NS – VH CDR1 (КАБАТ) SYAMS
76	3B6-NS – VH CDR1 (ЧОТИА) GFTFSSY
77	3B6-NS – VH CDR2 (КАБАТ) GITGTGGSTYYADSVKG

78	3B6-NS – VH CDR2 (ЧОТИА) TGTGGS
79	3B6-NS – VH CDR3 (КАБАТ) RAGGSFYYYYGMDV
80	3B6-NS – VH CDR3 (ЧОТИА) RAGGSFYYYYGMDV
81	3B6-NS – VL CDR1 (КАБАТ) RSSQSLHSTGYNYLD
82	3B6-NS – VL CDR1 (ЧОТИА) RSSQSLHSTGYNYLD
83	3B6-NS – VL CDR2 (КАБАТ) LGSNRAS
84	3B6-NS – VL CDR2 (ЧОТИА) LGSNRAS
85	3B6-NS – VL CDR3 (КАБАТ) MQALQTPWT
86	3B6-NS – VL CDR3 (ЧОТИА) MQALQTPWT
87	2E1.2 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGSSGRYYNYFDY WGQGTLVTVSS
88	2E1.2 – VL2 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYHCQYQNKWLIFGGGKVEIK
89	2E1.2 - VH CDR1 (КАБАТ) SYGMH
90	2E1.2 - VH CDR1 (ЧОТИА) GFTFSSY

91	2E1.2 - VH CDR2 (КАБАТ) VIWDDGSNKYYADSVKG
92	2E1.2 - VH CDR2 (ЧОТИА) WDDGSN
93	2E1.2 - VH CDR3 (КАБАТ) AGSSGRYYNYFDY
94	2E1.2 - VH CDR3 (ЧОТИА) AGSSGRYYNYFDY
95	2E1.2 - VL2 CDR1 (КАБАТ) RASQSVRSNLA
96	2E1.2 - VL2 CDR1 (ЧОТИА) RASQSVRSNLA
97	2E1.2 - VL2 CDR2 (КАБАТ) GASTRAT
98	2E1.2 - VL2 CDR2 (ЧОТИА) GASTRAT
99	2E1.2 - VL2 CDR3 (КАБАТ) QQYNKWLI
100	2E1.2 - VL2 CDR3 (ЧОТИА) QQYNKWLI
101	1B5-NK - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSFGMHWVRQAPGKGLEWVTLIWF DGS SKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGFAAVAGWYDF FW GRGTLVTVSS
102	1B5-NK - VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGVKYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS TLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQKYFSAPYTFGQGTKLEIK
103	1B5-NK - VH CDR1 (КАБАТ) SFGMH
104	1B5-NK - VH CDR1 (ЧОТИА)

	GFTFSSF
105	1B5-NK - VH CDR2 (КАБАТ) LIWFDGSSKYYADSVKG
106	1B5-NK - VH CDR2 (ЧОТИА) WFDGSS
107	1B5-NK - VH CDR3 (КАБАТ) GFAAVAGWYFDF
108	1B5-NK - VH CDR3 (ЧОТИА) GFAAVAGWYFDF
109	1B5-NK – VL CDR1 (КАБАТ) RASQGVKRYLA
110	1B5-NK – VL CDR1 (ЧОТИА) RASQGVKRYLA
111	1B5-NK – VL CDR2 (КАБАТ) AASTLQS
112	1B5-NK – VL CDR2 (ЧОТИА) AASTLQS
113	1B5-NK –VL CDR3 (КАБАТ) QKYFSAPYT
114	1B5-NK – VL CDR3 (ЧОТИА) QKYFSAPYT
115	3G5 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgacctgggttttctcgttgctctttaagagggtccagtgtaggtgagttggggaatct</u> Ggggaggcggtggtccagcctgggaagtcctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtagcaatg Gcattcactgggtccgccaggctccaggcaagggctggagtggtggcagttatctgctgatggaagtaataa Attctatgcagactccgtgaaggccgattcacatctccagagacaattccaagaacagctatactgcaaatga Acagcctgagagccgaggacacggctgtatattactgtgcagagcctctggttcggggagttattataacttcttg actactggggccagggaaccctggtcaccgtctctca
116	3G5 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggaagcccagcagcagcttctctcctctgactctggctcccagatagcactggagaaatagtgatgacgcag</u>

	Tctccagccaccctgtctgttctccaggggaaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtgtagaagtaac Ttagcctggtagcagagaaacctggccaggtcccaggtctctatctatggtagcaccagggccatggatcc Cagccaggttcagtgagctgggtctgggacagagttcactctcaccatcaacagcctgcagtcgaagatttgcagt ttattactgtcagcagcataataagtgatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaa
117	3С3 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctgggttttctctgttctcttttaagaggttccagtgtcaggtgcagctgggagctgg</u> Gggaggcgtggctcagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagggctgggattcttgcagtcgctatggcatg Tactgggtccgagcctcaggaaggggctggagtggtggcagttataggtatggaggtataaataactat Gcagactccgtgaaggccgattcaccatctcagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg Agagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaatcaccatggtagtactttgactactggggccagggaacc ctggtcaccgtctcctct
118	3С3 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggacatgagggtccctgctcagctcctgggactcctgctgctggctcccagataccagatgtgacatccagatgac</u> Ccagctccatctcctctgtcagctgtaggagacagagtcaccatcactgcccggcgagtcagggcattagcaatta Ttagcctggtagcagagaaaccagggaaagtctcaagctctgatctatgctcagcatttgcacatcaggggtccc Atctcggttcagtgagctggatctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgttcaactta ttactgtcaaaagtataagagtgccccattcactttcgccctgggaccaaagtgatataaaa
119	3В6 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctgggttttctgtgctattttaaaaggttccagtgtaggtgcagctgtggagctgggg</u> Gaggcttgtagcagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgattcaccttagcagctatgcatgagct Gggtccgagcctcagggaaagggctggagtggtctcaggtataactgtagctggtagcactactacgagcag Actcctgaaaggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatgcaaatgaacagcctgagagc Cgaggacacggcctatattactgtgcgaaaagggctgggagcttctactactacggtatggagctgtggggcc aagggaccaggtcaccgtctcctca
120	3В6 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atgaggctccctgctcagctcctgggctgctaagtctctgggtctctggatccagtgaggatattgtgactcagctc</u> Cactctcctgcccgtcaccctggagagccggcctcctctcctgcaggtctagtcagagcctcctgcatagtagtggata Caactattggattggtagctcagaaagccagggcagctccacagctcctgatctatttgggttctaactgggctccggg Gtccctgacaggttcaatggcagtgatcaggcacagattttactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatttgg ggtttattactgcatgcaagctctcaaaactcctggagcttcggccacgggaccaaggtggaaatcaaaa
121	6Н6 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctgggtattctctgttctcttttaagaggttccagtgtcaggtgcagctgggagctgggg</u>

	Gaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagattctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtagctatggcatgcaactg Ggtccgccagctccaggcaagggctggagtggtggcagttatgggatgatggaagtaataatactatgcagact Cgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacagcgtgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagg Acacggctgtcttactgtgcagagcgggggttcggggaggtattataactactttgactactggggccagggaaacct ggtcaccgtctcctca
122	6Н6 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggaagccccagcgcagcttctctcctgctactctggctcccagataccactggagaatagtgatgacgcagctctcc</u> Agccaccctgtctgtctccaggggaaagagcaccctctcctgcagggcagtcagagtgtagaagcaacttagcctgg Taccagcagaacctggccaggtcccagctcctcatctatgtgcatccaccagggccactggtatcccagcaggttgag Tggcagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctgcagctgaagatttgagtttactgtcagcagca Taataactggctcactttcggcggaggaccaaggtggagatcaaa
123	1В4 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctggcttttctgtggctattttaaagggtccaatgtaggtgcagctgttggaatctggggga</u> Ggctgtgtacagctggggggtccctgagactctcctgtgcggcctctgggtcacctttagcagctatgccatgactgggtc Cgcagggtccagggaaaggcctggagtggtctcaggtattactgtagtggtgtaaacattctacagactcctgga Agggccggttaccatttcagagacaattccaataattcgtgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgatgacacggc Cgtatactactgtgcgaaaagaatggggagttactactactactacggcatggagctgtggggccaagggaccaggtc accgtgtcctca
124	1В4 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atgaggctccctgctcagctcctgggctgctaagctctggctctgatccagtgaggatattgtgactcagctctccac</u> Tctccctgcccgcacccctggagagccgctccatctcctgcaggtcaagtgcagcctcctgcatagtagtgatacaacta Tttgattggtacctgcagaagccagggcagctccacaactcctgatctattgggttctaaccggcctccggggtccctgac Aggttcagtggtcagtgatcagcagacagatttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttggggtttactactg catgcaagctctacaattccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaa
125	2Е1.2 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>AtggagttgggctgagctgggtttcctcgttctcttttaagagggtccagtgtaggtgcagctggtagtctggggaggcgtggtCag</u> cctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtagctatggcatgactgggtccgcccaggtccaggcaAggggct ggagtggtggcagttatgggatgatggaagtaataatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagAcaattccaag aacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagcgggaagttcggggaggtattataact actttgactactggggccagggaaacctggtcaccgtctcctca
126	2Е1.2 VL2 с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggaagccccagcgcagcttctctcctgctactctggctcccagataccactggagaatagtgatgacgcagctctccagcca</u>

	ccctgtctgtgtctccagggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtaggagcaacttagcctggtatcagcaga aacctggccaggctcccaggctcctcatctatgggtcatccaccagggccactggtatcccagacaggttcagtgagtggtctg ggacagagttcactctcaccatcagcagcctcagctgaagattttcagttatcactgtcagcagataataagtggtcattttc ggcggagggaccaaggtggagatcaaa
127	1B5 VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctgggttttctcgttctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctgggagctctggggaggcgtggtccagc</u> Ctgggaggtccctgagactctcgtgtcagcgtctgattcacctcagtagctttggcatgcactgggtccaggctccaggcaagggctgg aGtgggtgacacttatatggtttgatggaagtctaaatactatgcagactccgtgaaggccgattcacatctccagagacaactcaacaac acGctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccaggacacggctgtatattactgtgtgagaggttttcagcagtgctgggtggtacttca tttctggggcctggcacctggtcactgtctcctca
128	1B5 VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggacatgagggctcctgctcagctcctgggactcctgctctgctggctccagataccagatgtgacatccagatgaccagtcctcatcctcc</u> cTgtctcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggagtcagggcgttagaaagtatttagcctggtatcagcagaaccaggga aAgttctaaactctgatctatctgctcatcctttgcaatcaggggtccatctcggttcagtggtgagctgggacagatttctctcac caTcagcagcctgagcctgaagatgtgcaactattactgtcaaaagtatttcagtgccccgtacactttggccagggaccaactggaga tcaaa
129	3B6-NS VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>Atggagttgggctgagctgggttttctgtggctattttaaagggtgtccagtgtaggtgcagctgttgagctctggggaggcct</u> ggtacagcctgggggtccctgagactctcgtgtcagcctctgattcacctttagcagctatgcatgagctgggtccggcaggct ccagggaagggctggagtgggtctcaggtataactggtactggtgtagcacatactacgagactccgtgaaggccgggtcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtatgtgcaaatgaacagcctgagagccaggacacggcctatattactgtgcga aaagggtggtgggagcttactactactacggtatggagctctggggccaaggaccaggtcaccgtctcctca
130	3B6-NS VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>atgaggctcctgctcagctcctgggctgctaagtctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgactcagctcctcactctcc</u> ctgcccgtcaccctggagagccggcctcatctcctgcaggtctagtcagacctcctgcatagtagtactggatacaactattggattg gtacctgcagaagccaggcagctcctcagctcctgatctattgggttctaactgggctccgggtccctgacaggttcagtggc agtggtcagggacagatttcaactgaaaatcagcagagtgaggctgaggattttggggtttattactgcatgcaagcttcaaa actcctggagcttccggcaggaccaggtggaatcaaa
131	1B5-NK VH с подчеркнутой лидерной последовательностью <u>atggagttgggctgagctgggttttctcgttctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctgggagctctggggaggcgt</u>

	<p>ggtcagcctgggaggtcctgagactctctgtgcagcgtctggattcacctcagtagctttggcatgactgggtccgccaggctc caggcaaggggctggagtggtgacacttatatggtttgatggaagttctaaatactatgcagactccgtgaagggccgattacca tctccagagacaactccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccaggacacggctgtatattactgtgtgaga ggttttgagcagtggtgggtgactctgatttctggggccgtggcacctggctactgtctctca</p>
132	<p>IB5-NK VL с подчеркнутой лидерной последовательностью <i>Atggacatgagggctcctgctcagctcctgggactcctgctgctctggctcccagataccagatgtgacatccagatgaccagctc catctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgcggggcagtcagggcgttagaaagtatttagcctggtatca gcagaaaccagggaagttcctaagctctgatctatgctgcatccactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagtgagtgga tctgggacagatttactctcaccatcagcagcctgagcctgaagatgttgcaactattactgtcaaaagtattcagtgccccgta cactttggccaggggaccaactggagatcaaa</i></p>
133	<p>Внеклеточный домен CD40 человека EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCH QHXYCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCEEGWHTSEACESCVLHRSCSPGFVKQIA TGVSDTICEPCPVGFNSVSSAFEKCHPWTSCKETDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRL R</p>
134	<p>Константная область тяжелой гамма-цепи иммуноглобулина 2 (IgH2) (Uniprot P01859) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVER KCCVECPPECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
135	<p>Тяжелая цепь 3C3, в которой вариабельная область выделена курсивным шрифтом и константный домен выделен жирным шрифтом <i>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRYGMVWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSYKYY</i> <i>ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPWYFFDYWGQGLTVTVSSAST</i> KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ</p>

	SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
136	Легкая цепь 3С3, в которой переменная область выделена курсивным шрифтом и константный домен выделен жирным шрифтом <i>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLQSGVPSRFS</i> <i>GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYKSAFTFGPGTKVDIK</i> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQ</u> <u>LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST</u> <u>LTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u>
137	Тяжелая цепь 3С3, в которой лидерная последовательность выделена подчеркиванием, переменная область выделена курсивным шрифтом и константный домен выделен жирным шрифтом <u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRVGMVWRQ</u> <u>APGKGLEWVAIVWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARES</u> <u>PWYFDFYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTV</u> SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKV DKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
138	Легкая цепь 3С3, в которой лидерная последовательность выделена подчеркиванием, переменная область выделена курсивным шрифтом и константный домен выделен жирным шрифтом <u>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPG</u> <u>KVPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYKSAFTFGPGTKV</u> <u>DIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS</u> <u>QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC</u>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агонистическое выделенное моноклональное антитело, которое связывается с CD40 человека, причем указанное антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 19, 21, 23 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25, 27, 29 соответственно.

2. Антитело по п.1, которое дополнительно проявляет по меньшей мере одно из следующих свойств:

- (а) индуцирует клеточный апоптоз;
- (б) усиливает активность клетки, направленную на стимуляцию Т-клеток, измеренную на основании увеличения экспрессии ИЛ-12p40;
- (в) усиливает активацию В-клеток, измеренную на основании увеличения экспрессии по меньшей мере одного маркера клеточной поверхности, выбранного из группы, состоящей из HLA-DR V450, CD54-ФЭ, CD86-АФЦ и CD83 BV510, CD19 V500, CD54-ФЭ, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69-АФЦ, CD86-АФЦ, CD38 PerCP-Cy5.5 и CD71-ФЭ;
- (г) связывается с CD40 человека с равновесной константой диссоциации K_d, составляющей 10⁻¹⁰ М или менее;
- (е) перекрестно реагирует с CD40 яванских макак; и/или
- (ф) связывается с CD40 человека, что приводит к активации клеток, измеренной с помощью репортерной линии клеток, управляемой NFκB.

3. Антитело по п.1, которое содержит константную область тяжелой цепи IgG2.

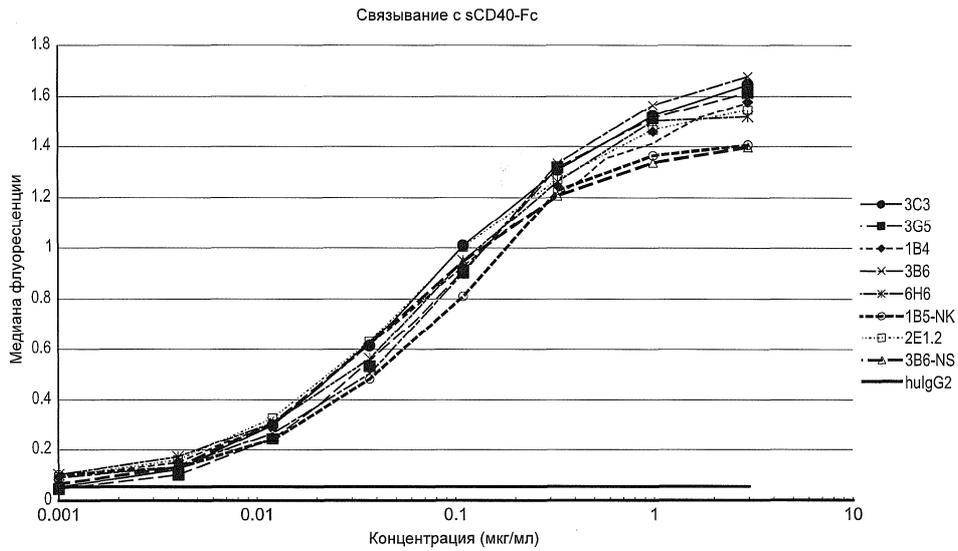
4. Выделенное антитело, которое связывается с CD40 человека и содержит CDR последовательности из переменных областей тяжелой и легкой цепей, соответственно содержащие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17 и 18.

5. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой антитело человека.

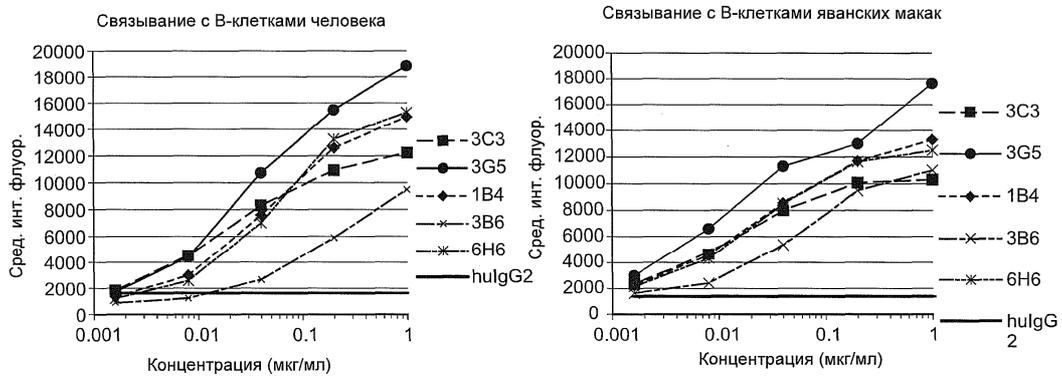
6. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное антитело содержит константную область человека.
7. Антитело по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, фрагмент Fab, Fab', (Fab')₂, Fv или scFv.
8. Молекулярный конъюгат, содержащий антитело по любому из пп.1-7, соединенное с опухолевым антигеном, аутоантигеном или компонентом патогена.
9. Биспецифическая молекула для индукции или усиления иммунного ответа на раковую клетку, содержащая антитело по любому из пп.1-7, соединенное со второй молекулой, где вторая молекула связывается с рецептором Т-клеток, рецептором НК-клеток или другим рецептором фактора некроза опухоли.
10. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела по любому из пп.1-7.
11. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-7.
12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая как переменную область тяжелой цепи, так и переменную область легкой цепи антитела по любому из пп.1-7.
13. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-12.
14. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.13.
15. Композиция для индукции или усиления иммунного ответа на раковую клетку, содержащая указанное антитело по любому из пп.1-7, молекулярный конъюгат по п.8 или биспецифическую молекулу по п.9 и носитель.
16. Композиция по п.15, дополнительно содержащая адъювант.
17. Композиция по п.15, дополнительно содержащая одно или более других антител.
18. Композиция по п.17, где указанное одно или более других антител связываются с CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, галектином-9, CEACAM1, BTLA, CD69, галектином-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, DR3 или CD28H.
19. Способ индукции или усиления иммунного ответа против антигена у субъекта, включающий введение указанному субъекту антитела по любому из пп.1-7, молекулярного конъюгата по п.8, композиции по любому из пп.15-18 или биспецифической молекулы по п.9 в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа против антигена.
20. Способ по п.19, дополнительно включающий этап введения антигена, где указанный антиген вводят одновременно, отдельно или последовательно относительно введения указанного антитела, композиции или биспецифической молекулы.
21. Способ ингибирования роста CD40-экспрессирующих клеток, включающий приведение указанных клеток в контакт с антителом по любому из пп.1-7, композицией по любому из пп.15-18 или биспецифической молекулой по п.9 в количестве, эффективном для ингибирования размножения CD40-экспрессирующих клеток.
22. Способ индукции или усиления иммунного ответа на раковую клетку у субъекта, включающий введение указанному субъекту антителом по любому из пп.1-7, композицией по любому из пп.15-18 или биспецифической молекулой по п.9 в эффективном количестве, где рак выбран из группы, состоящей из хронического лимфобластного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, первичной лимфомы центральной нервной системы, лимфомы Беркитта и В-клеточной лимфомы из клеток краевой зоны.
23. Способ по любому из пп.19-22, дополнительно включающий введение субъекту одного или более терапевтических агентов, где указанный терапевтический агент представляет собой другое антитело, выбранное из группы, включающей антитело к PD-1, антитело к PD-L1 и антитело к CTLA-4.
24. Способ по п.23, отличающийся тем, что указанные первое и второе антитела вводят одновременно или последовательно.
25. Применение антитела по любому из пп.1-7 для индукции или усиления иммунного ответа против антигена у субъекта.
26. Применение антитела по любому из пп.1-7 в производстве лекарственного средства для индукции или усиления иммунного ответа на раковую клетку.

Клон	KD (пМ)	Kon (1/Мс)	Kdis (1/с)
3С3	10.7	$8,13 \times 10^5$	$8,67 \times 10^{-6}$
3G5	3.3	$9,05 \times 10^5$	$2,97 \times 10^{-6}$
1В4	10.5	$8,32 \times 10^5$	$8,76 \times 10^{-6}$
3В6	7.9	$7,82 \times 10^5$	$6,14 \times 10^{-6}$
6Н6	2.8	$9,05 \times 10^5$	$2,49 \times 10^{-6}$

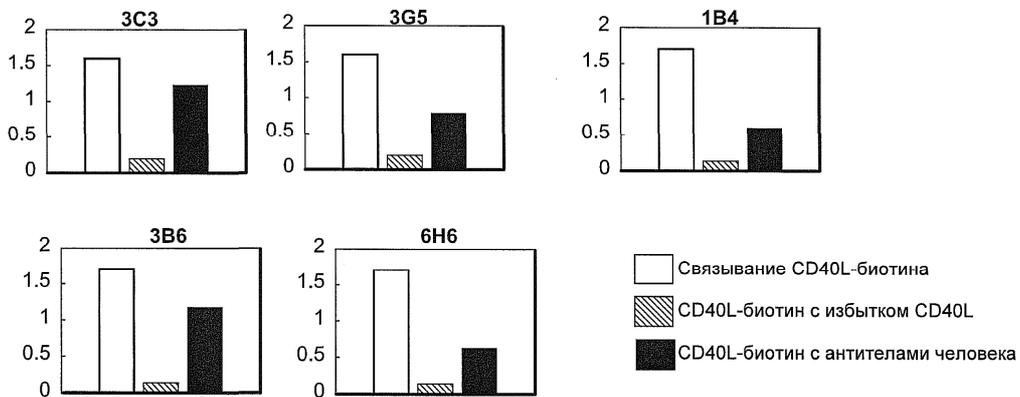
Фиг. 1



Фиг. 2

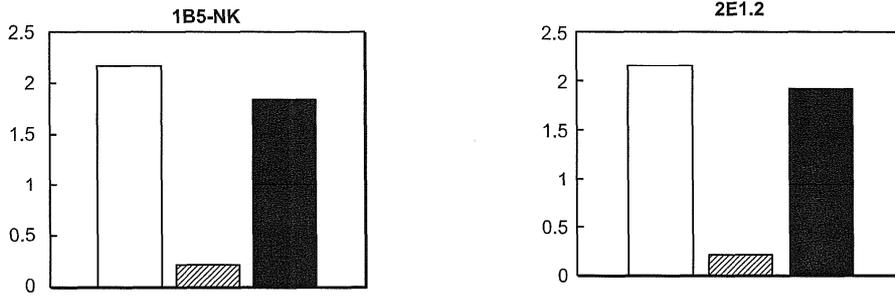


Фиг. 3

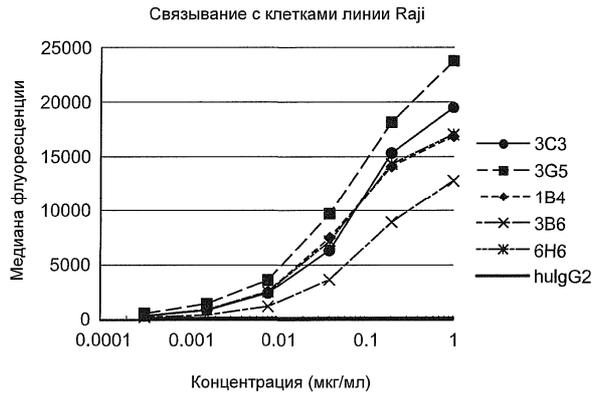


Фиг. 4А

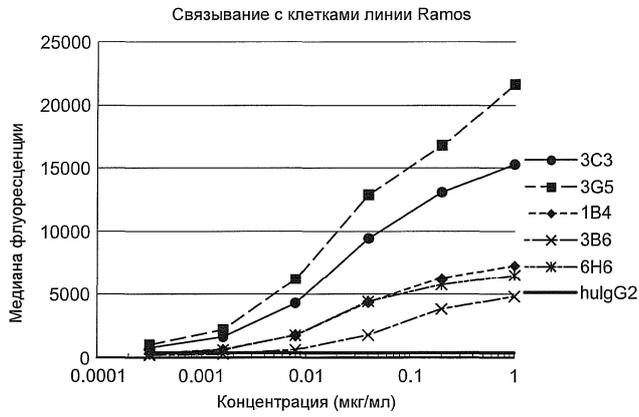
Блокирование CD40L



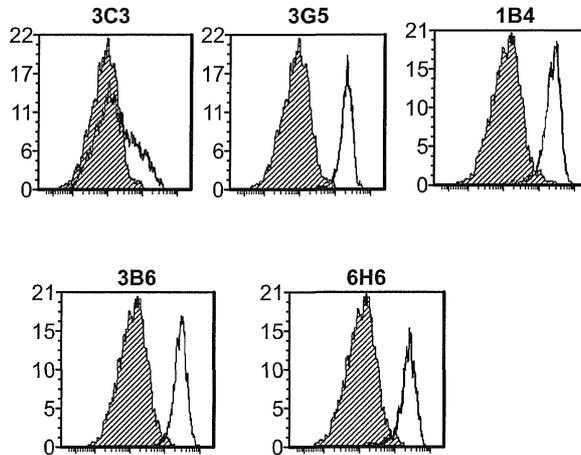
Фиг. 4B



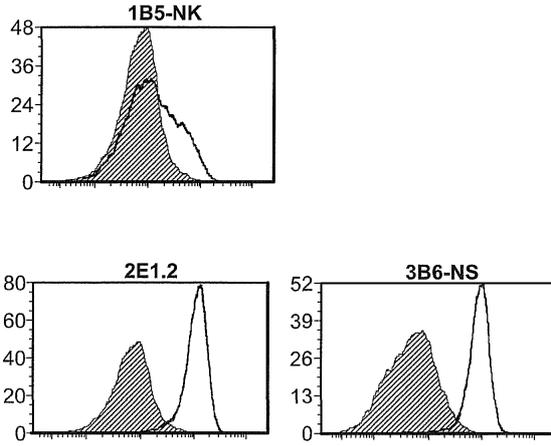
Фиг. 5



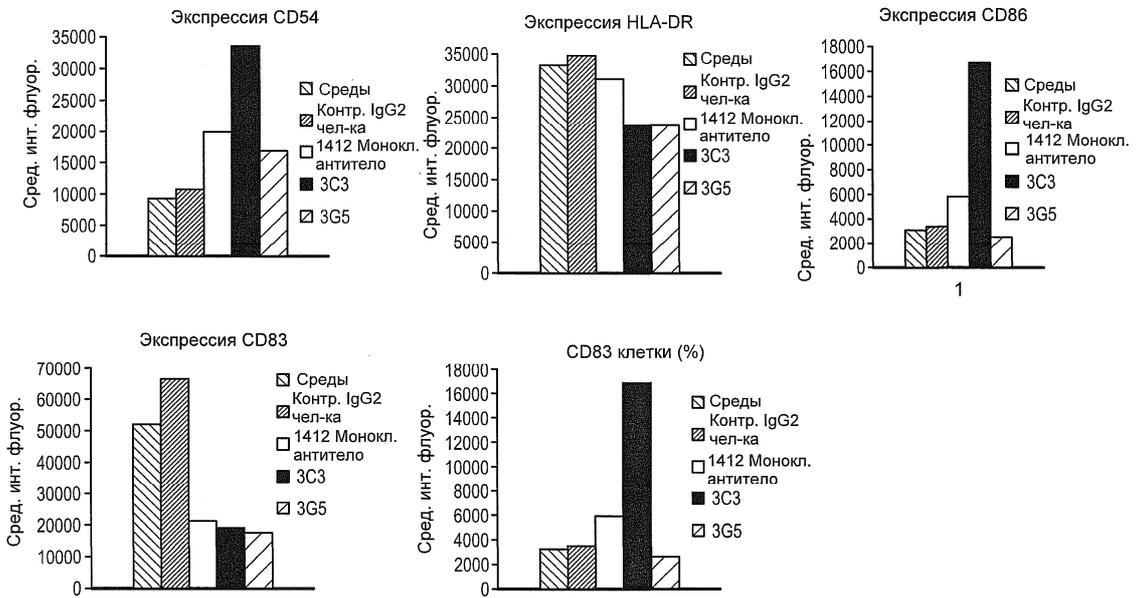
Фиг. 6



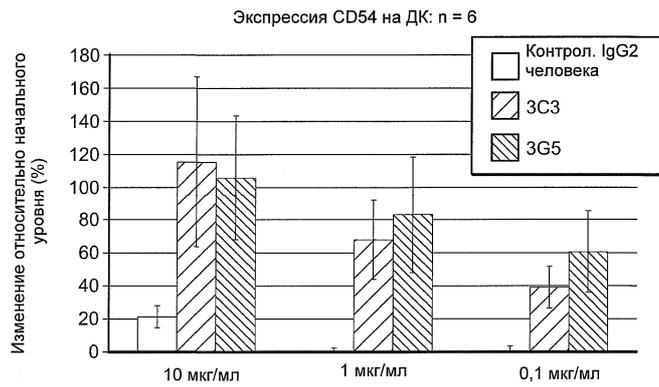
Фиг. 7A



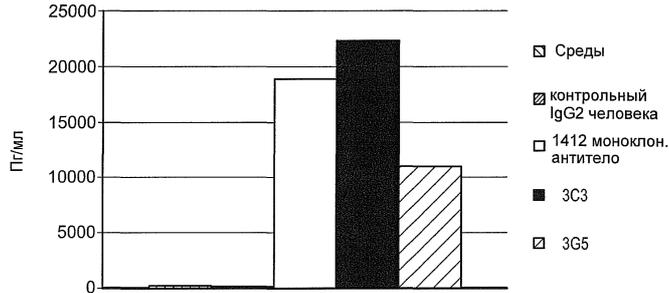
Фиг. 7B



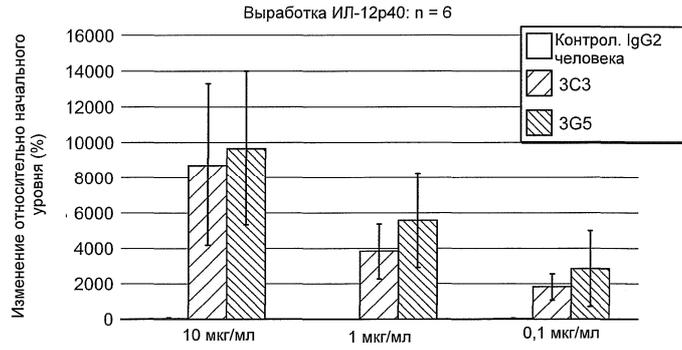
Фиг. 8А



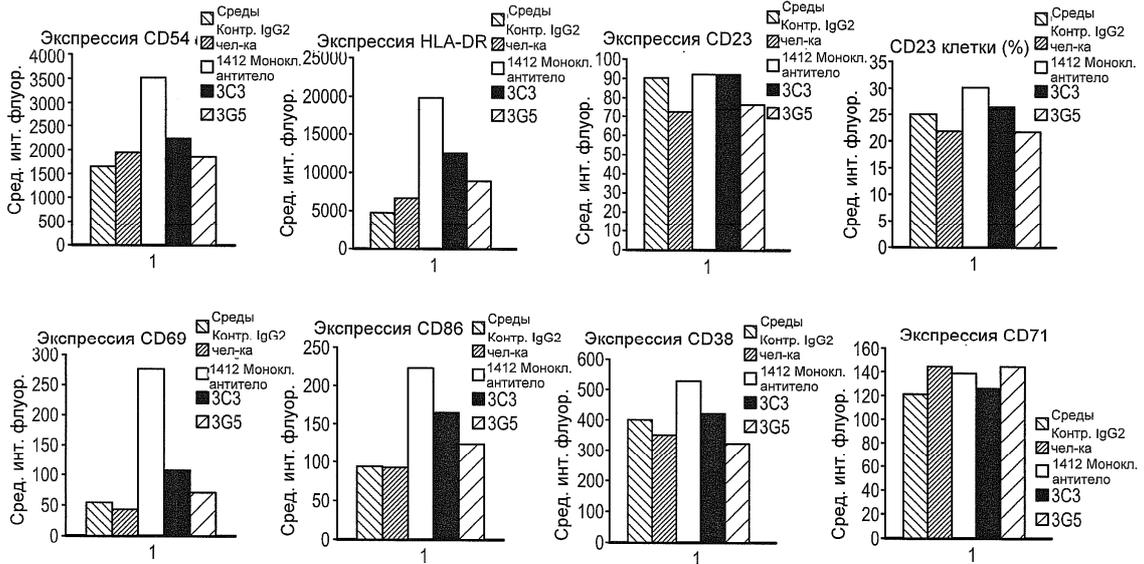
Фиг. 8B



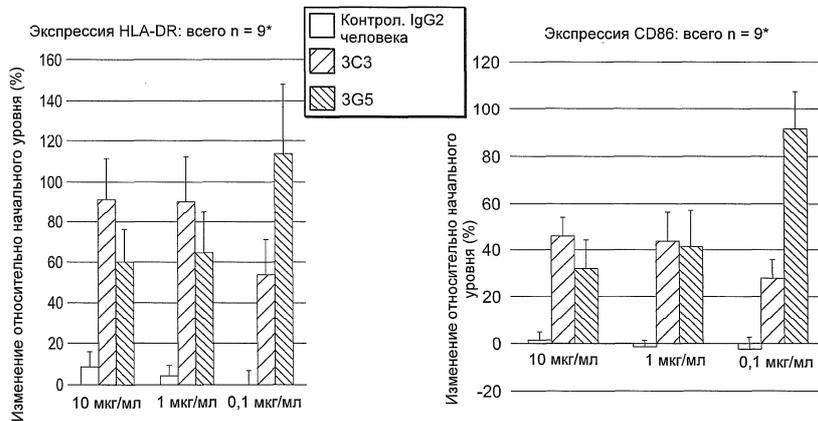
Фиг. 9А



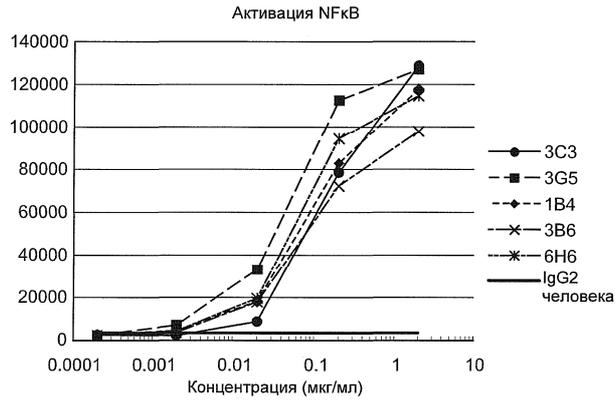
Фиг. 9В



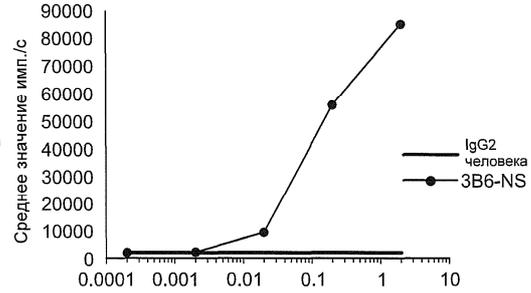
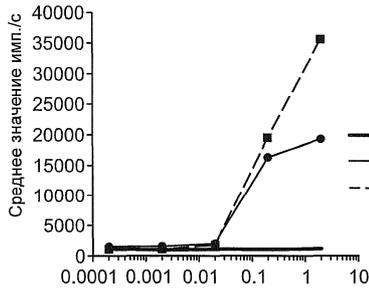
Фиг. 10А



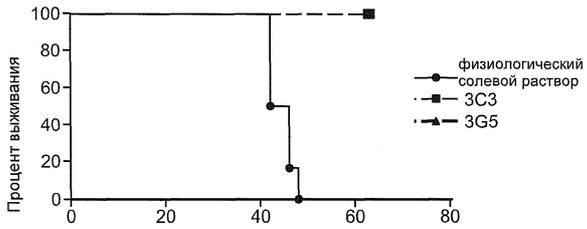
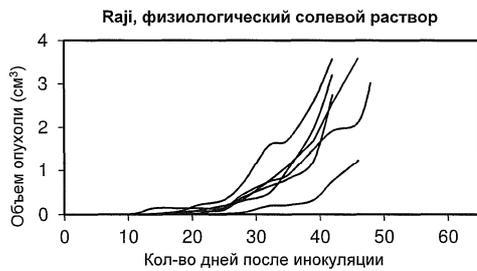
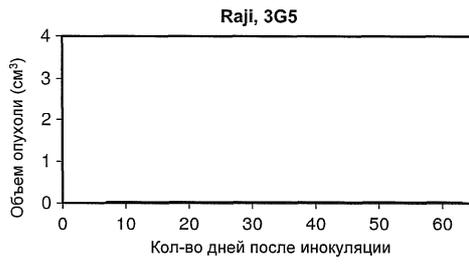
Фиг. 10В



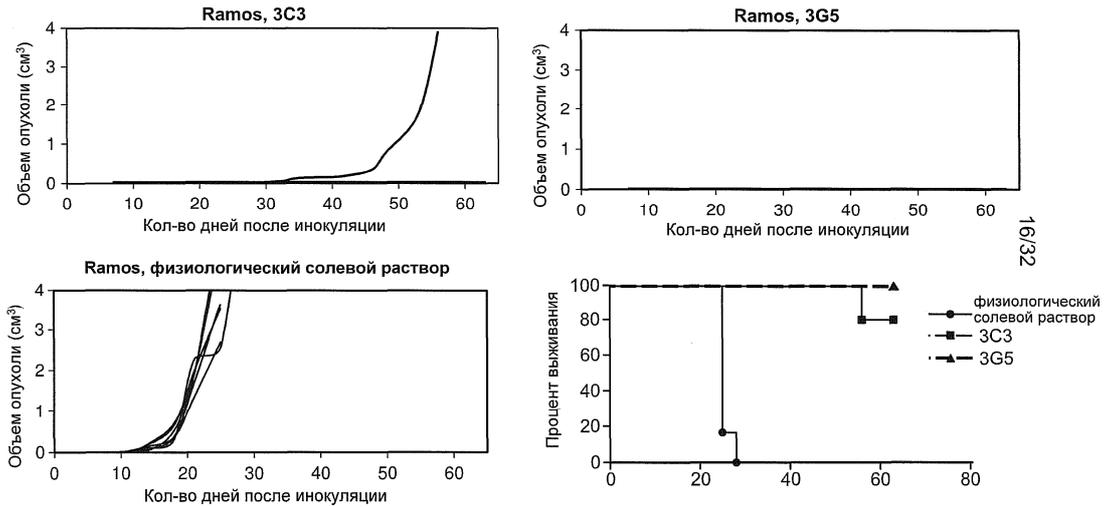
Фиг. 11А



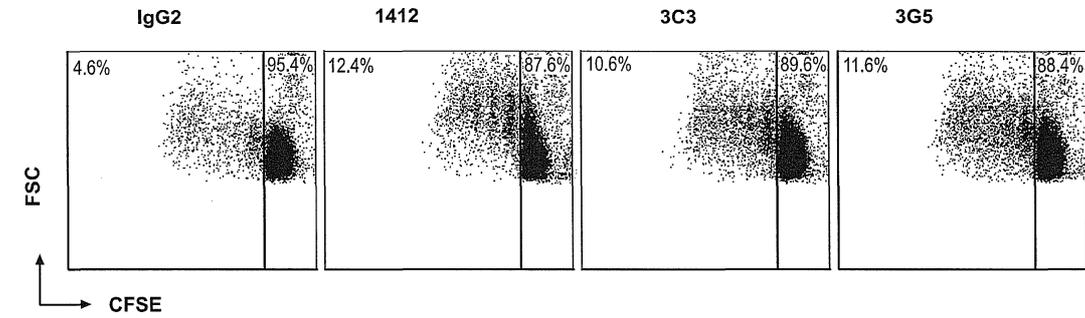
Фиг. 11В



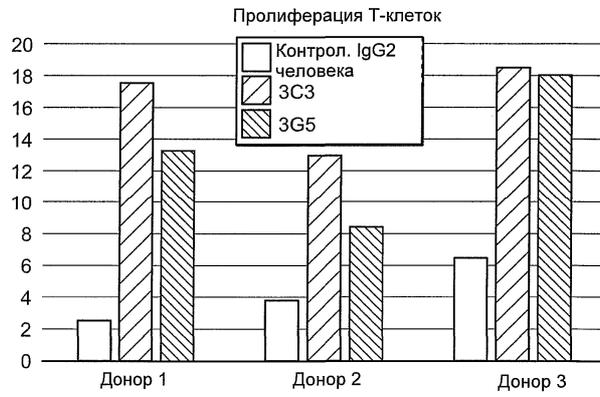
Фиг. 12



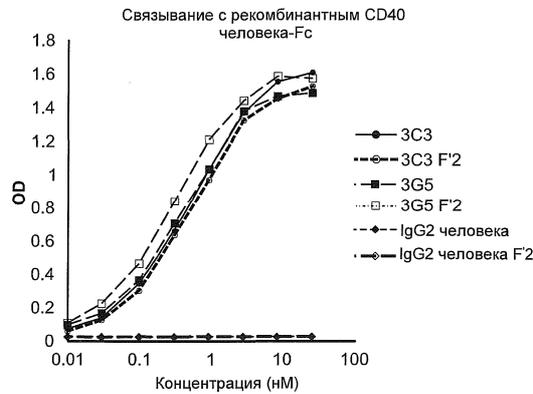
Фиг. 13



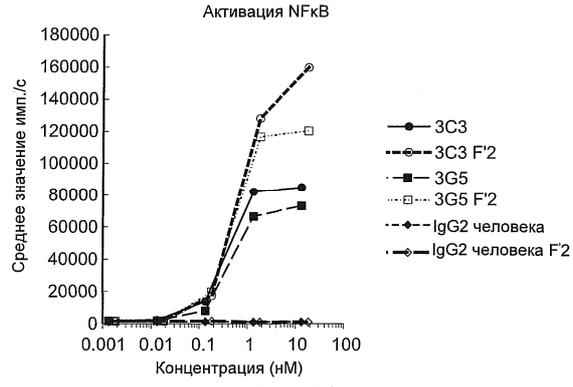
Фиг. 14А



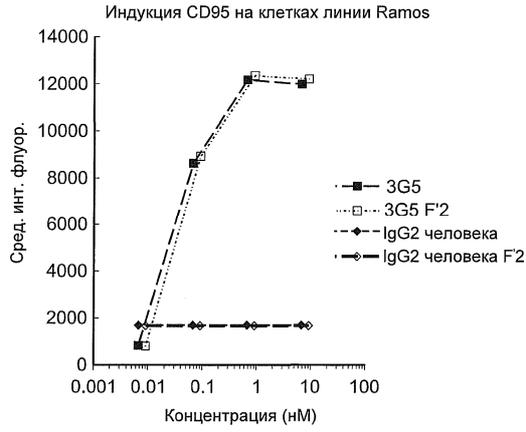
Фиг. 14В



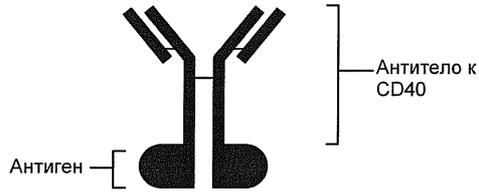
Фиг. 15



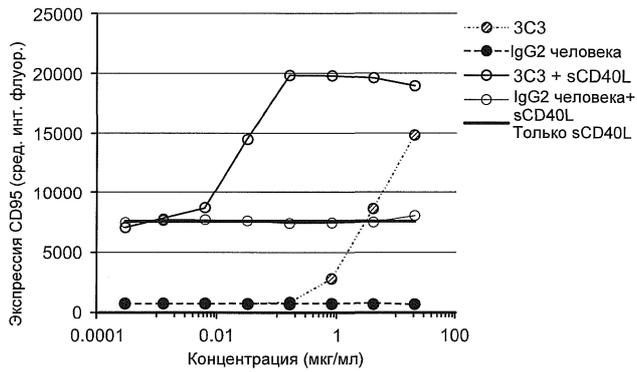
Фиг. 16



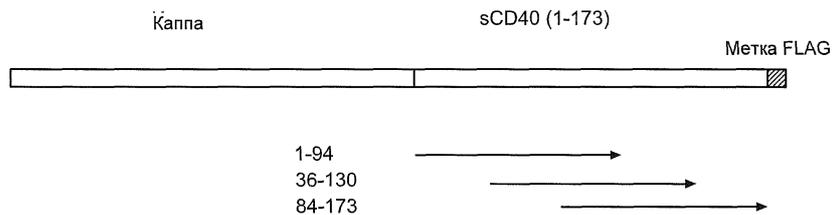
Фиг. 17



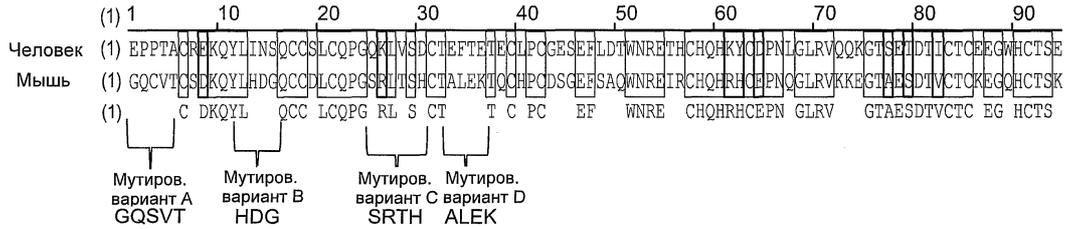
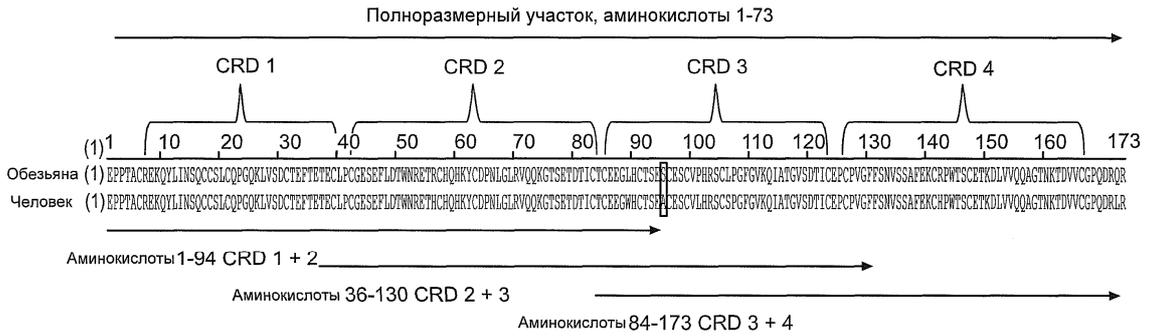
Фиг. 18



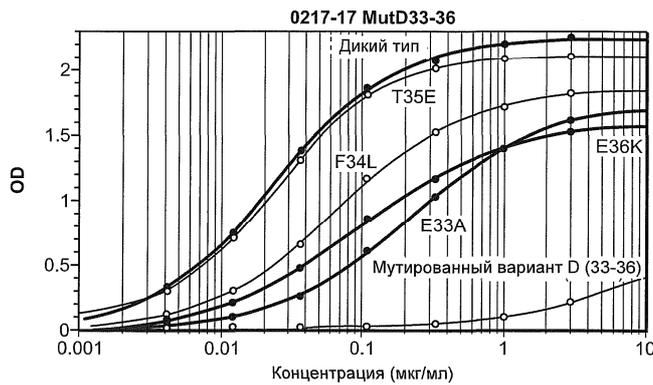
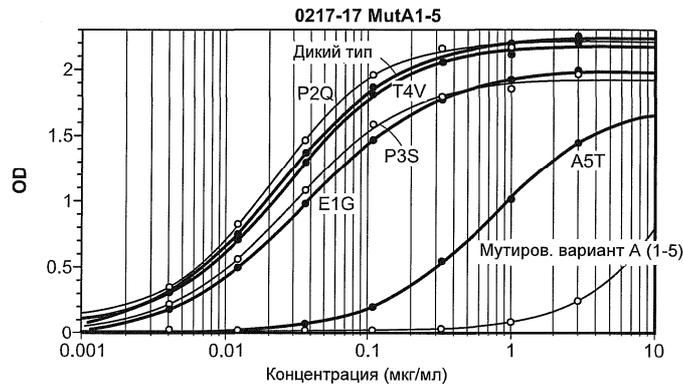
Фиг. 19



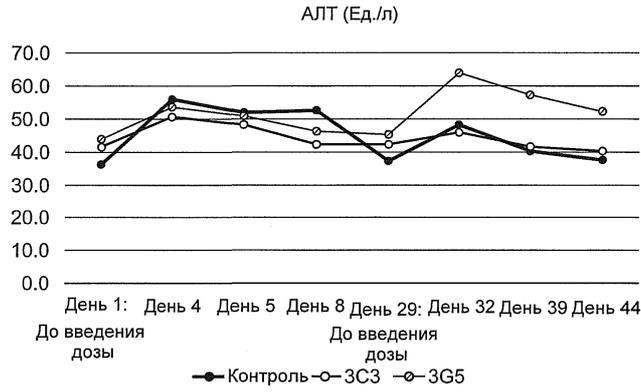
Фиг. 20



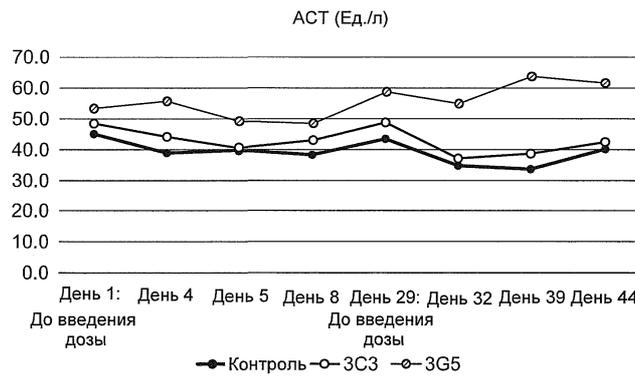
Фиг. 21



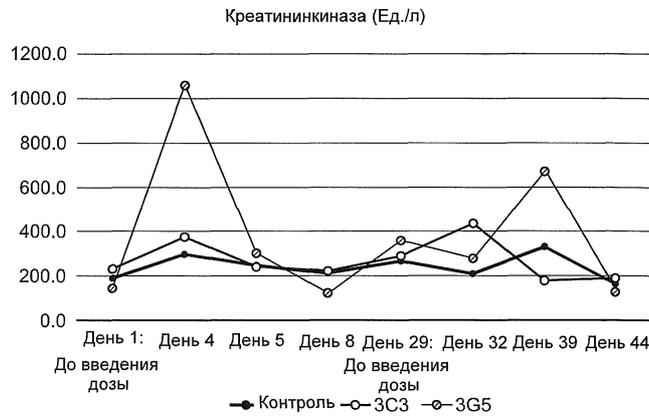
Фиг. 22



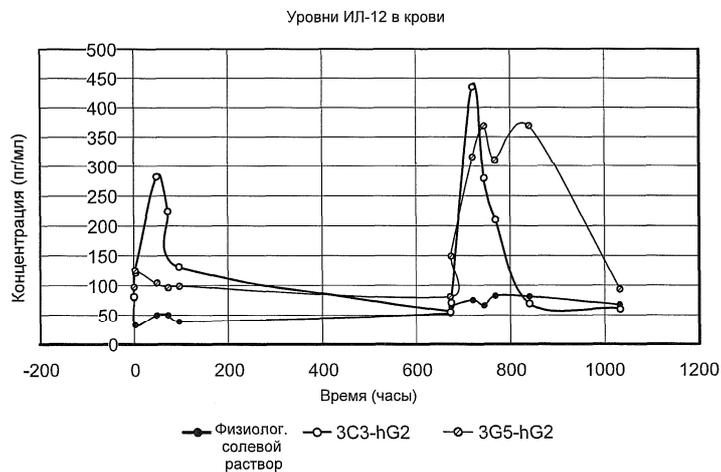
Фиг. 23А



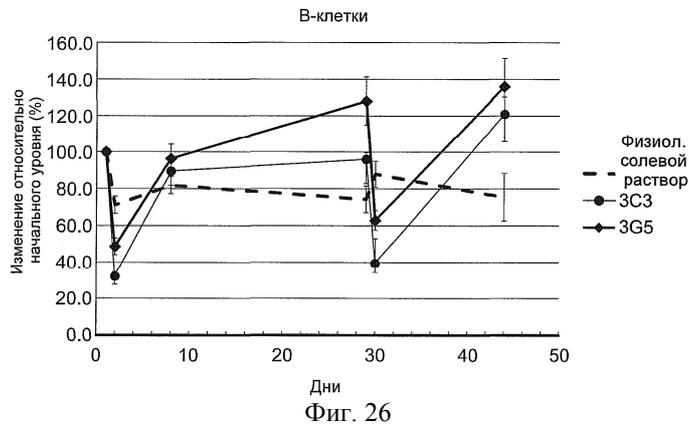
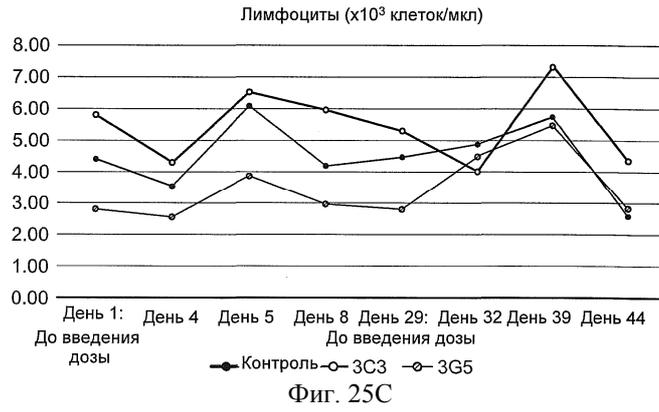
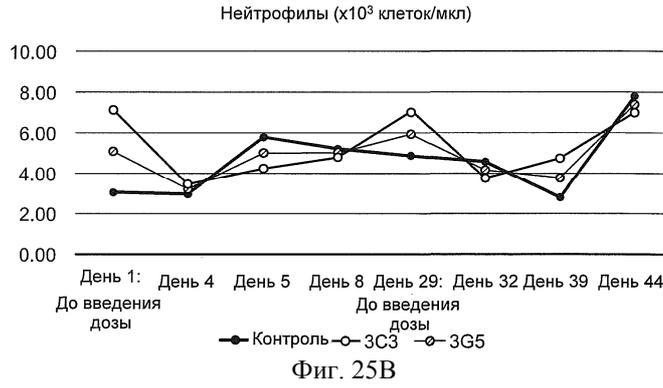
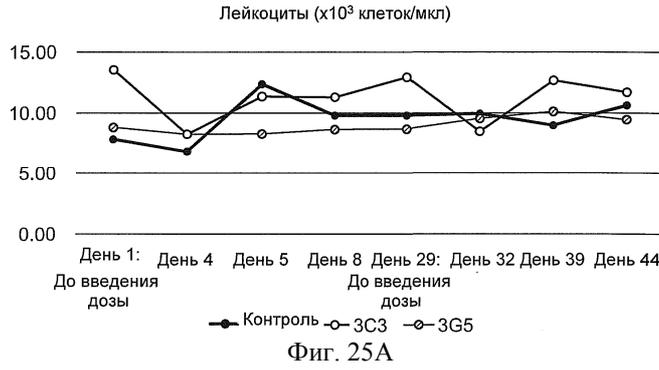
Фиг. 23В



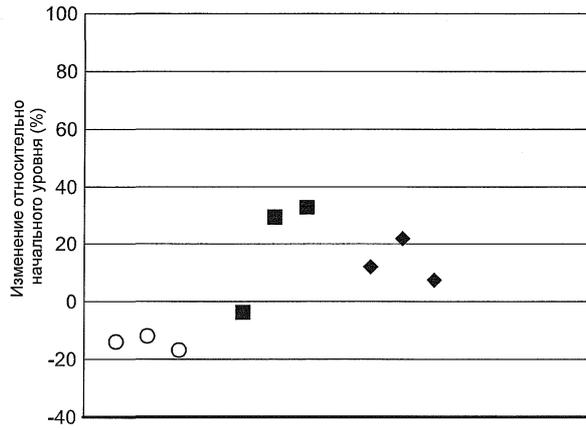
Фиг. 23С



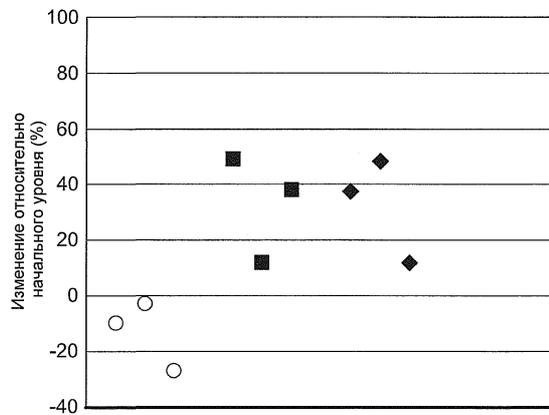
Фиг. 24



Экспрессия HLA-DR на В-клетках после дозы 2 мг

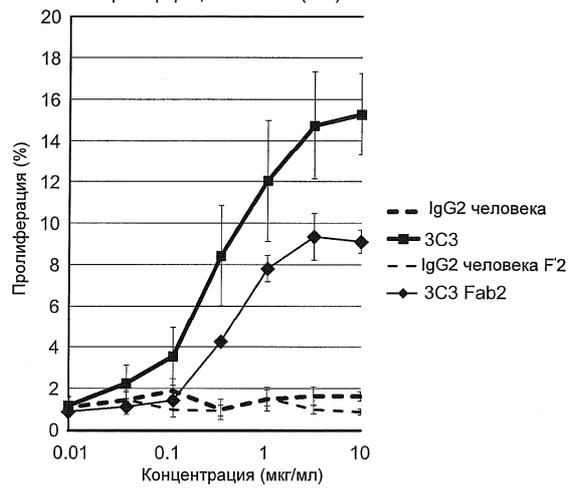


Экспрессия HLA-DR на В-клетках после дозы 0,2 мг



Фиг. 27

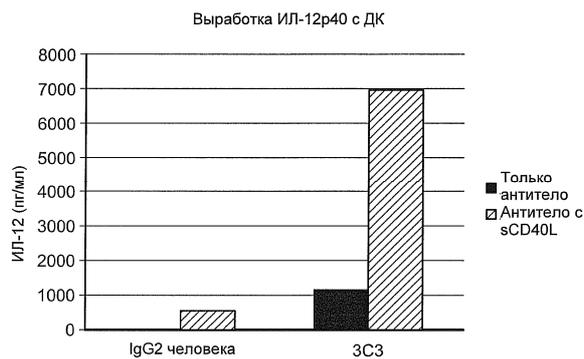
Пролиферация В-клеток (n=3)



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

Цитокиновый ответ в количественном исследовании цельной крови

	ИЛ-1 β				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
Контр. IgG2 чел-ка	0,2	1,4	1,6	13	4,5
ЛПС	682	697	885	882	858
3C3	0,1	1,3	1	11,3	5,6
	ИЛ-6				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
Контр. IgG2 чел-ка	2,1	1	12,3	1,3	2,9
ЛПС	12,5	12,6	11,6	11,7	16
3C3	1,9	0,9	11	1,2	2,5
	ФНО- α				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
Контр. IgG2 чел-ка	0,6	0,7	1,4	1	1,3
ЛПС	45,2	43,9	48,7	45,6	27,5
3C3	0,7	1,2	1,5	1,1	1,6
	ИФН- γ				
	Донор 1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
hIgG2 control	BD	BD	BD	BD	0,5
LPS	BD	BD	BD	49,8	BD
3C3	BD	BD	BD	BD	1,3

Фиг. 31

