



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 123398

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2018 02170</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>04.08.2016</b>	Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys / Gobburu J.V., Tenhoo C., Rogge M.C. et al. // Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1998. - Vol. 286, no.2. - P. 925 – 930
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	<b>01.04.2021</b>	WO 0124823 A1, 12.04.2001
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>62/201,150, 62/367,660</b>	US 2008305116 A1, 11.12.2008
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>05.08.2015, 28.07.2016</b>	US 2013030159 A1, 31.01.2013
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US</b>	WO 2012058137 A2, 03.05.2012
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>10.05.2018, Бюл.№ 9</b>	WO 2012118903 A2, 07.09.2012
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію:	<b>31.03.2021, Бюл.№ 13</b>	WO 2006125201 A2, 23.11.2006
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2016/045574, 04.08.2016</b>	US 2003103978 A1, 05.06.2003
<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Франсон Йоган (CA), Леу Жослен (US), Обмолова Галіна (US), Сурі Аніш (BE), Тен Фан (US), Тепляков Алексєй (US), Чжоу Гун (US)</b>		Effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura / Kuwana M., Nomura Sh., Fujimura K. et al. // Blood. – 2003. - Vol. 103, no. 4. - P. 1229 - 1236
<b>(73)</b> Володілець (володільці): <b>ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК., 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, United States of America (US)</b>		Engineering of a Novel Anti-CD40L Domain Antibody for Treatment of Autoimmune Diseases / Xie J.H., Yamniuk A.P., Borowski V. et al. // The journal of immunology. – 2014. - Vol. 192, No. 9. - P. 4083 – 4092
<b>(74)</b> Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович</b>		Anti-CD40L immune complexes potentially activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice / Robles-Carrillo L., Meyer T., Hatfield M. et al. // The journal of immunology. – 2010. - Vol. 185, No. 3. - P. 1577-1583
		The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation / Langer F., Ingersoll S.B., Amirkhosravi A. et al. // Thrombosis and haemost. – 2005. - Vol. 93, No. 6. - P. 1137-1146
		Pinelli D.F. Novel insights into anti-CD40/CD154 immunotherapy in transplant tolerance / Pinelli D.F., Ford M.L. // Immunother. – 2015. - Vol. 7, No. 4. - P. 399-410
		NCBI P29965 CD40L_HUMAN. 22.07.2015
		[Інтернет публікація], URL: <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/P29965">https://www.uniprot.org/uniprot/P29965</a> (знайдено 21.07.2020)

UA 123398 C2

---

**(54) ВИДІЛЕНЕ АНТАГОНІСТИЧНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄ CD154, ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА ЙОГО МІСТИТЬ**

---

**(57)** Реферат:

Винахід стосується виділеного антагоністичного антитіла, або його антигензв'язуючої ділянки, яке специфічно зв'язує CD154 людини. Також винахід стосується полінуклеотиду, вектору, клітини-хазяїна, способу отримання виділеного антагоністичного антитіла, або його антигензв'язуючої ділянки, яке специфічно зв'язує CD154, імунокон'югату, фармацевтичної композиції.

Перехресне посилання на споріднені заявки

Ця заявка заявляє про встановлення переваги щодо попередньої заявки США № 62/367,660, поданої 28 липня 2016 р., і попередньої заявки США № 62/201,150, поданої 5 серпня 2015 р., причому весь зміст вищезазначених заявок включено в цей документ у повному обсязі шляхом посилання.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Цей винахід стосується антитіл, які специфічно зв'язують CD154, полінуклеотидів, які кодуєть антитіла або фрагменти, і способів отримання й використання вищезгаданого.

Рівень техніки

CD154, також відомий як CD40-ліганд (CD40L), gp39, TNF-споріднений білок активації (TRAP), антиген 5с8 або T-BAM, являє собою тримерний трансмембранний білок надродини фактора некрозу пухлин (TNF). CD154 експресується на поверхні Т-клітин CD4<sup>+</sup> залежним від активації, обмеженим у часі способом. Після активації CD154 також експресується на підмножині Т-клітин CD8<sup>+</sup>, базофілах, мастоцитах, еозинофілах, клітинах-натуральних кілерах, В-клітинах, макрофагах, дендритних клітинах і тромбоцитах. CD154 також існує у вигляді розчинної форми в крові.

CD154 зв'язується з CD40 на антигенпрезентуючих клітинах (APC), що призводить до різних відповідей залежно від типу клітин-мішеней. Взаємодія CD40 із CD154 має важливе значення для нормальної взаємодії Т- і В-клітин, включаючи підвищену коstimуляцію, праймінг Т-клітин, виробництво цитокінів, перемикання класів антитіл і дозрівання афінності, а також виробництво антитіл і аутоантитіл.

Було продемонстровано, що руйнування шляху CD40/CD154 через блокування CD154 є корисним для лікування аутоімунних захворювань, таких як системний червоний вовчак (СЧВ), ревматоїдний артрит (РА), розсіяний склероз (РС), запальне захворювання кишечника (ЗЗК), цукровий діабет I типу (T1D) і відторгнення алотрансплантата. У людей мутації в CD40 або CD154 призводять до синдрому гіпер-IgM, який характеризується відсутністю ізотипів IgG або IgA (Aruffo et al., Cell 72:291, 1993).

Антитіла до CD154 були описані, наприклад, у міжнародних патентних публікаціях № WO1993/08207, WO1994/10308, WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860, WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 і WO2013/056068.

Було продемонстровано ефективність антитіл до CD154 у лікуванні аутоімунних захворювань у людей. Проте подальшому клінічному удосконаленню заважала тромбоемболія внаслідок активації тромбоцитів, яка спостерігалася під час лікування. Було продемонстровано, що причиною активації тромбоцитів антитілом до CD154 під назвою 5с8 є взаємодія з FcγR11а на тромбоцитах (Xie et al., J Immunol 192:4083–4092, 2014).

Таким чином, існує потреба в додаткових антитілах до CD154 з покращеними профілями безпечності й ефективності.

Суть винаходу

У винаході запропоновано антагоністичне антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154 людини з SEQ ID NO: 1, які містять область, що визначає комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) і HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), де необов'язково залишок S1 у HCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T або V; залишок I4 у HCDR1 піддається мутації на M, L або V; залишок S5 у HCDR1 піддається мутації на A; залишок S3 у HCDR2 піддається мутації на A, T або V; залишок P4 у HCDR2 піддається мутації на V, T, L Q або E; залишок N8 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y; залишок T9 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y; залишок N10 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y; залишок S1 у HCDR3 піддається мутації на A або M; залишок R2 у HCDR3 піддається мутації на A, S, Q або K; і залишок L7 у HCDR3 піддається мутації на M.

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, причому антитіло містить певні амінокислотні послідовності VH і VL, як описано в цьому документі.

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, причому антитіло містить певні амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3, як описано в цьому документі.

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, яке містить

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 44 і 52 відповідно;

VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66; або

важкий ланцюг із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154 із SEQ ID NO: 1, причому CD154 являє собою гомотример, і антитіло зв'язує перший мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 182–207 CD154 і другий мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 176–253 CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

У винаході також запропоновано імунокон'югат, який містить антитіло або антигензв'язуючу ділянку антитіла за цим винаходом, зв'язані з терапевтичним агентом або агентом для візуалізації.

У винаході також запропоновано фармацевтичну композицію, що містить антитіло за цим винаходом і фармацевтично прийнятний носій.

У винаході також запропоновано полінуклеотид, який кодує VH антитіла за цим винаходом, VL антитіла за цим винаходом або VH і VL антитіла за цим винаходом.

У винаході також запропоновано вектор, що містить полінуклеотид за цим винаходом.

У винаході також запропоновано клітину-хазяїна, що містить вектор за цим винаходом.

У винаході також запропоновано спосіб отримання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом в умовах, за яких відбувається експресія антитіла, і виділення антитіла, виробленого клітиною-хазяїном.

У винаході також запропоновано спосіб лікування аутоімунного захворювання або імуніопосередкованого запального захворювання, який включає введення терапевтично ефективної кількості виділеного антитіла за цим винаходом або фармацевтичної композиції за цим винаходом пацієнтові, який цього потребує, протягом часу, достатнього для лікування захворювання.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке зв'язується з антитілом за цим винаходом.

У винаході також запропоновано набір, який містить антитіло за цим винаходом.

Короткий опис рисунків

На Фіг. 1 продемонстровано вплив Fc-фрагмента антитіла на активацію тромбоцитів імунними комплексами (IC) CD154 : антитіло. IC із розчинного CD154 людини (shCD154, позначеного на фігурі як sCD40L) і антитіла 5c8 до CD154 (ізотип IgG1) (IC 5c8IgG1) активували тромбоцити, тоді як IC із shCD154 і 5c8, клонованого на основних ланцюгах IgG1 з пригніченою функцією IgG1sigma, IgG1sigma-YTE, IgG2sigma або IgG2sigma-YTE (5c8IgG1z, 5c8IgG1z-YTE, 5c8IgG2z або 5c8IgG2z-YTE відповідно), не мали ефекту. Активацію тромбоцитів оцінювали як % від загального числа тромбоцитів, що експресують PAC-1 (антитіло PAC-1 специфічно розпізнає конформаційно активну форму інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ) і CD62p (поверхнева експресія P-селектину). АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль. Оцінювання активації тромбоцитів виконували у п'яти донорів. Результати показані як середнє значення для кожного експерименту  $\pm$  стандартне відхилення (СВ).

На Фіг. 2 продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L на цій фігурі) і IgG2sigma/к антитіла до CD154 C4LB5, C4LB89, C4LB189, C4LB191, C4LB199 і C4LB150 з пригніченою ефекторною функцією не активують тромбоцити. Активацію тромбоцитів оцінювали як % від загального числа тромбоцитів, що експресують PAC-1 і CD62p. IC із shCD154 і 5c8IgG1 (IC 5c8IgG1) активували тромбоцити. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. Оцінювання активації тромбоцитів виконували у п'яти донорів. Результати показані як середнє значення для кожного експерименту  $\pm$  стандартне відхилення (СВ).

На Фіг. 3 продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L) і антитіла до CD154 C4LB89 (IgG2sigma/к), C4LB231 (IgG1sigma/к) і C4LB232 (IgG1sigma/к) не активують тромбоцити. Активацію тромбоцитів оцінювали як % від загального числа тромбоцитів, що

експресують PAC-1 і CD62p. IC 5c8-IgG1 активували тромбоцити, причому активація блокувалася антитілом до FcγIIa, що вказує на те, що активація тромбоцитів IC CD154/5c8-IgG1 опосередковується FcγRIIa, присутнім на тромбоцитах. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль. Оцінювання активації тромбоцитів виконували у п'яти донорів. Результати показані як середнє значення для кожного експерименту ± стандартне відхилення (СВ).

На Фіг. 4 продемонстровано поверхню взаємодії між CD154 і C4LB89. Ароматичні залишки F55, Y101 і Y102 у HCDR2 і HCDR3 сприяють найбільшій кількості взаємодій (нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 59). Легкий ланцюг C4LB89 не сприяє зв'язуванню.

На Фіг. 5 продемонстровано двовимірний графічний рисунок епітопних і паратопних залишків, ідентифікованих із кристалічної структури CD154 мавпи-ігрунки в комплексі з C4LB89. Епітопні залишки обведені овалом, і показані паратопні залишки в HCDR1, HCDR2 і HCDR3 важкого ланцюга (позначені на фігурі як CDR1, CDR2 і CDR3). Антитіло зв'язується одночасно з двома мономерами CD154 А і В. Нумерація епітопних залишків відповідає CD154 людини (SEQ ID NO: 1), а нумерація паратопних залишків відповідає варіабельній області важкого ланцюга C4LB89 (SEQ ID NO: 59).

На Фіг. 6А продемонстровано вирівнювання залишків 1–180 CD154 людини (SEQ ID NO: 1, верхній рядок) і CD154 мавпи-ігрунки (SQ ID NO: 2, нижній рядок), де показано, що епітопні залишки C4LB89 між CD154 людини й мавпи-ігрунки є консервативними. Епітопні залишки на мономері 1 CD154 підкреслено лінією, а епітопні залишки на мономері 2 підкреслено подвійною лінією.

На Фіг. 6В продемонстровано вирівнювання залишків 181–261 CD154 людини (SEQ ID NO: 1, верхній рядок) і CD154 мавпи-ігрунки (SQ ID NO: 2, нижній рядок), де показано, що епітопні залишки C4LB89 між CD154 людини й мавпи-ігрунки є консервативними. Епітопні залишки на мономері 1 CD154 підкреслено лінією, а епітопні залишки на мономері 2 підкреслено подвійною лінією.

На Фіг. 7 продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L на цій фігурі) і IgG1/к антитіла до CD154 C4LB237 не активують тромбоцити, тоді як IC із shCD154 і іншого IgG1-антитіла 5c8 активують тромбоцити. Застосування одних тільки антитіл не впливало на активацію тромбоцитів, що оцінювали як % від загального числа тромбоцитів, які експресують PAC-1 і CD62p. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль. Оцінювання активації тромбоцитів виконували у п'яти донорів. Результати показані як середнє значення для кожного експерименту ± СВ. У кожній групі n = 4.

На Фіг. 8А продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L на цій фігурі) і C4LB119 із нефункціональним Fc активують тромбоцити FcγRIIa-незалежним способом, тоді як IC із shCD154 і антитіла з доменами VH/VL C4LB119, експресованими на IgG1 (C4LB287), активували тромбоцити FcγRIIa-залежним способом. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль.

На Фіг. 8В продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L на цій фігурі) і C4LB94 із нефункціональним Fc активують тромбоцити FcγRIIa-незалежним способом, тоді як IC із shCD154 і антитіла з доменами VH/VL C4LB94, експресованими на IgG1 (C4LB289), активували тромбоцити FcγRIIa-залежним способом. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль.

На Фіг. 8С продемонстровано, що імунні комплекси (IC) із shCD154 (sCD40L на цій фігурі) і C4LB83 із нефункціональним Fc помірно активують тромбоцити, тоді як IC із shCD154 і антитіла з доменами VH/VL C4LB83, експресованими на IgG1 (C4LB288), активували тромбоцити FcγRIIa-залежним способом. АДФ (аденозиндифосфат): позитивний контроль. ФБР (фосфатно-сольовий буферний розчин): негативний контроль.

#### Детальний опис винаходу

Усі публікації, включаючи, серед іншого, патенти й патентні заявки, наведені в цьому описі, включені в цей документ шляхом посилання так, нібито їх було викладено повністю.

Необхідно розуміти, що термінологія в цьому документі вживається виключно для опису певних варіантів втілення й не має обмежувального характеру. Якщо не вказано інше, усі технічні й наукові терміни, використані в цьому документі, мають те саме значення, яке зазвичай розуміє звичайний фахівець у галузі, до якої належить цей винахід.

У цьому винаході й у формулі винаходу форми однини включають форми множини, крім випадків, коли контекст чітко вимагає іншого тлумачення.

Незважаючи на те, що будь-які способи й матеріали, аналогічні або еквівалентні тим, які описані в цьому документі, можуть бути використані на практиці для тестування цього винаходу,

у цьому документі описано ілюстративні матеріали й способи. В описі й формулі цього винаходу використовуватиметься така термінологія.

Термін «специфічне зв'язування» або «специфічно зв'язується» або «зв'язується» стосується зв'язування антитіла з антигеном або епітопом у антигені з більшою афінністю, ніж з іншими антигенами. Зазвичай антитіло зв'язується з антигеном або епітопом у антигені з константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М або менше, наприклад приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-11}$  М або менше або приблизно  $1 \times 10^{-12}$  М або менше, зазвичай із  $K_D$ , що принаймні в сто разів менший, ніж його  $K_D$  зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, бичачим сироватковим альбуміном (БСА), казеїном). Константу дисоціації можна виміряти з використанням стандартних процедур. Однак антитіла, які специфічно зв'язуються з антигеном або епітопом у антигені, можуть мати перехресну реактивність до інших споріднених антигенів, наприклад до того самого антигена від інших видів (гомологів), таких як людина або мавпа, наприклад *Macaca fascicularis* (яванський макак, суну), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) або *Callithrix jacchus* (ігрунка звичайна, marmoset). Моноспецифічне антитіло специфічно зв'язує один антиген або один епітоп, в той час як біспецифічне антитіло специфічно зв'язує два різні антигени або два різні епітопи.

Термін «нейтралізуючий», або «нейтралізує», або «нейтралізуюче антитіло», або «антагоніст антитіла», або «антагоніст», або «антагоністичний» стосується антитіла або його антигензв'язуючої ділянки, які частково або повністю інгібують біологічну активність CD154 людини. Антагоністичні антитіла можна ідентифікувати з використанням аналізів біологічної активності CD154, як описано в цьому документі. Антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 людини, може інгібувати біологічну активність CD154 людини на приблизно 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %.

Термін «CD154» стосується білка CD154 людини (hCD154) (наприклад, CD40L людини). Амінокислотну послідовність повнорозмірного білка CD154 людини продемонстровано в SEQ ID NO: 1. CD154 людини виявляється як на клітинній мембрані у вигляді мембранного білка типу II, так і існує у вигляді розчинної форми у плазмі. Зв'язана з мембраною форма CD154 містить залишки 1–261 із SEQ ID NO: 1, причому трансмембранний домен знаходиться між залишками 23–46, а позаклітинний домен охоплює залишки 47–261. Розчинна форма CD154 людини (shCD154) утворюється шляхом протеолітичної обробки зв'язаної з мембраною форми й містить залишки 113–261 із SEQ ID NO: 1 (амінокислотну послідовність shCD154 продемонстровано в SEQ ID NO: 4). І зв'язана з мембраною форма, і розчинна форма CD154 являють собою біологічно активні тримери. «CD154» охоплює різні форми CD154, включно з мономерною, димерною, тримерною, зв'язаною з мембраною й розчинною формами, а також природні різновиди CD154 людини. Розчинний тример CD154 людини (тример shCD154) складається з трьох поліпептидних ланцюгів, кожен із яких має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4.

У цьому документі термін «антитіла» вживається в широкому значенні й включає молекули імуноглобуліну, у тому числі моноклональні антитіла, у тому числі мишачі, людські, гуманізовані й химерні моноклональні антитіла, фрагменти антитіл, біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, димерні, тетрамерні або мултимерні антитіла, одноланцюгові антитіла, домени антитіл, і будь-яку іншу модифіковану конфігурацію молекули імуноглобуліну, яка містить сайт зв'язування з антигеном з бажаною специфічністю. «Повні молекули антитіла» складаються з двох важких ланцюгів (HC) і двох легких ланцюгів (LC), зв'язаних між собою дисульфідними зв'язками, а також їхніх мултимерів (наприклад, IgM). Кожен важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (VH) і константної області важкого ланцюга (складається з доменів CH1, CH2 і CH3). Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (VL) і константної області легкого ланцюга (CL). Області VH і VL можуть бути додатково розділені на області гіперваріабельності, які називають областями, що визначають комплементарність (CDR), які чергуються з каркасними областями (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох сегментів FR, розташованих у напрямку від амінокінця до карбоксикінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4.

«Області, що визначають комплементарність (CDR)» являють собою «антигензв'язуючі сайти» в антитілі. CDR можуть бути визначені з використанням різних термінів: (i) області, що визначають комплементарність (CDR), три у VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) і три у VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), базуються на варіабельності послідовностей (Wu and Kabat, J Exp Med 132:211–50, 1970; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991); (ii) «гіперваріабельні області», HVR або HV, три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3), стосуються областей варіабельних доменів антитіл, які мають гіперваріабельну структуру за визначенням Chothia and Lesk (Chothia and Lesk Mol Biol 196:901–17, 1987). Міжнародна база даних ImMunoGeneTics (IMGT)

(<http://www.imgt.org>) пропонує стандартизовану нумерацію й визначення антигензв'язуючих сайтів. Відповідність між визначеннями CDR, HV і IMGT описана в публікації Lefranc et al., *Dev Comparat Immunol* 27:55–77, 2003. Терміни «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» і «LCDR3» включають CDR, визначені за допомогою будь-якого зі способів, описаних вище, відповідно до Kabat, Chothia або IMGT, якщо в описі прямо не вказано інше.

Залежно від амінокислотної послідовності константного домену важких ланцюгів імуноглобуліни можна віднести до п'яти основних класів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM. IgA і IgG додатково поділяють на ізотипи IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> і IgG<sub>4</sub>. Легкі ланцюги антитіл будь-якого виду хребетних тварин можна віднести до одного з двох чітко відмінних типів, а саме каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотних послідовностей їхніх константних доменів.

Термін «фрагменти антитіл» або «антигензв'язуюча ділянка антитіла» стосується частини молекули імуноглобуліну, яка зберігає антигензв'язуючий сайт важких ланцюгів і/або легких ланцюгів, наприклад областей, що визначають комплементарність, важких ланцюгів (HCDR) 1, 2 і 3, областей, що визначають комплементарність, легких ланцюгів (LCDR) 1, 2 і 3, варіабельної області важкого ланцюга (VH) або варіабельної області легкого ланцюга (VL). Фрагменти антитіл включають добре відомі фрагменти Fab, F(ab')<sub>2</sub>, FD і Fv і доменні антитіла (dAb), що містять один домен VH. Домени VH і VL можуть бути зв'язані один з одним за допомогою синтетичного лінкера з утворенням різних типів конструкцій одноланцюгових антитіл, де домени VH/VL спарюються внутрішньомолекулярно або міжмолекулярно в тих випадках, коли домени VH і VL експресуються окремими конструкціями одноланцюгових антитіл з утворенням сайту зв'язування одновалентного антигена, наприклад, одноланцюговим Fv (ScFv) або димером; описані, наприклад, у міжнародній патентній публікації № WO1998/44001, міжнародній патентній публікації № WO1988/01649; міжнародній патентній публікації № WO1994/13804; міжнародній патентній публікації № WO1992/01047.

Термін «моноклональне антитіло» стосується популяції антитіл, що складаються з єдиної амінокислоти в кожному важкому й кожному легкому ланцюзі, за винятком можливих добре відомих змін, таких як видалення з важкого ланцюга антитіла С-кінцевого лізину. Моноклональні антитіла зазвичай зв'язують один антигенний епітоп за винятком того, що біспецифічні моноклональні антитіла зв'язують два різні антигенні епітопи. Моноклональні антитіла можуть мати гетерогенне глікозилювання в популяції антитіл. Моноклональне антитіло може бути моноспецифічним або мультиспецифічним або одновалентним, двовалентним або багатовалентним. Біспецифічне антитіло включене в термін «моноклональне антитіло».

«Виділене антитіло» означає антитіло або фрагмент антитіла, який по суті не містить інших антитіл, що мають різні антигенні властивості (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язує CD154, є по суті вільним від антитіл, які специфічно зв'язують інші антигени крім CD154). Термін «виділене антитіло» включає антитіла, виділені таким чином, що вони мають більш високий ступінь чистоти, наприклад антитіла, чисті на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %.

Термін «залишки Chothia» означає залишки VL і VH антитіл, пронумеровані відповідно до Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., *J Mol Biol* 273:927–48, 1997).

Термін «гуманізовані антитіла» стосується антитіл, у яких антигензв'язуючі сайти отримані з видів, відмінних від людини, а каркаси варіабельної області отримані з послідовностей людського імуноглобуліну. Гуманізовані антитіла можуть включати заміщення в областях каркасів, так що каркас може не бути точною копією експресованого людського імуноглобуліну або генних послідовностей зародкової лінії.

Термін «людські антитіла» означає антитіла, що мають варіабельні області важкого й легкого ланцюгів, у яких каркас і антигензв'язуючий сайт отримані з послідовностей людського походження. Якщо антитіло містить константну область або ділянку константної області, цю константну область також отримують із послідовностей людського походження.

Людське антитіло містить варіабельні області важкого або легкого ланцюга, які «отримані з» послідовностей людського походження, якщо варіабельні області антитіла отримують із системи, у якій використовуються гени імуноглобулінів зародкової лінії людини або перебудованих імуноглобулінів. Прикладами таких систем є бібліотеки генів людських імуноглобулінів, продемонстровані на фагові, і трансгенних тварин, відмінних від людини, наприклад мишей або щурів із локусами людського імуноглобуліну, як описано в цьому документі. «Людське антитіло» може містити амінокислотні відмінності порівняно з послідовностями імуноглобуліну зародкової лінії або перебудованого імуноглобуліну внаслідок, наприклад, природних соматичних мутацій або навмисного введення заміщень у каркас або антигензв'язуючий сайт, або в обидва. Зазвичай амінокислотна послідовність «людського антитіла» принаймні приблизно на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %.

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності, що кодується геном імуноглобуліну зародкової лінії людини або перебудованого імуноглобуліну. У деяких випадках «людське антитіло» може містити консенсусні каркасні послідовності, отримані з аналізу людської каркасної послідовності, наприклад, як описано в публікації Knappik et al., J Mol Biol 296:57–86, 2000, або синтетичну HCDR3, введена в бібліотеки генів імуноглобулінів людини, продемонстровані на фагові, наприклад, як описано в публікації Shi et al., J Mol Biol 397:385–96, 2010 і міжнародній патентній публікації № WO2009/085462.

Виділені гуманізовані антитіла є синтетичними. У той час як людські антитіла отримують із послідовностей імуноглобуліну людини, вони можуть бути отримані з використанням таких систем, як фаговий дисплей, що включає синтетичні CDR і/або синтетичні каркаси, або можуть піддаватися мутагенезу *in vitro*, щоб покращити властивості антитіл, що призводить до отримання антитіл, які не експресуються в репертуарі зародкової лінії людських антитіл *in vivo*.

Антитіла, у яких антигензв'язуючі сайти отримано з видів не людського походження, не включені у визначення терміну «людське антитіло».

Термін «рекомбінантний» включає антитіла й інші білки, які отримують, експресують, створюють або виділяють рекомбінантними способами.

У контексті цього документа термін «епітоп» стосується частини антигена, з якою специфічно зв'язується антитіло. Епітопи зазвичай складаються з хімічно активних (наприклад, полярних, неполярних і гідрофобних) поверхневих скупчень функціональних груп, таких як амінокислоти або бічні ланцюги полісахаридів, і можуть мати специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики зарядів. Епітоп може складатися з суміжних і/або несуміжних амінокислот, які утворюють конформаційну просторову одиницю. Для несуміжного епітопа амінокислоти з різних частин лінійної послідовності антигена опиняються в безпосередній близькості в 3-вимірному просторі в результаті складання білкової молекули.

Термін «паратоп» означає частину антитіла, з якою специфічно зв'язується антиген. Паратоп може мати лінійну природу або може бути переривчастий, утворений просторовим взаємозв'язком між несуміжними амінокислотами антитіла, а не лінійною низкою амінокислот. Терміни «паратоп легкого ланцюга» і «паратоп важкого ланцюга» або «амінокислотні залишки паратопа легкого ланцюга» і «амінокислотні залишки паратопа важкого ланцюга» стосуються залишків легкого ланцюга і залишків важкого ланцюга антитіла, що перебувають у контакті з антигеном, відповідно, або загалом термін «залишки паратопа антитіла» стосується тих амінокислот антитіла, які контактують з антигеном.

Термін «біспецифічний» стосується антитіла, що специфічно зв'язує два різні антигени або два різні епітопи в межах того самого антигена. Біспецифічне антитіло може мати перехресну реактивність з іншими спорідненими антигенами або може зв'язувати епітоп, спільний для двох або більше різних антигенів.

Термін «мультиспецифічний» стосується антитіла, що специфічно зв'язує принаймні два різні антигени або принаймні два різні епітопи в межах того самого антигена. Мультиспецифічне антитіло може зв'язувати, наприклад, два, три, чотири або п'ять різних антигенів або різних епітопів у межах того самого антигена.

«У комбінації з» означає, що лікарські засоби або терапевтичні засоби вводять суб'єктові, наприклад людині, разом у вигляді суміші, одночасно у вигляді окремих агентів або послідовно у вигляді окремих агентів у будь-якому порядку.

Термін «біологічна активність CD154» стосується будь-якої активності, що виникає в результаті зв'язування CD154 із його рецептором CD40. Біологічна активність CD154 може являти собою, наприклад, CD154-опосередковану активацію В-клітин CD40<sup>+</sup> або дендритних клітин (ДК), або низхідну активацію сигнальних шляхів CD40. Біологічну активність CD154 можна виміряти з використанням добре відомих способів і способів, описаних у цьому документі, наприклад за допомогою вимірювання CD154-опосередкованої проліферації В-клітин або активації В-клітин шляхом оцінювання стимуляції ICAM-1 або підвищення продукції цитокінів В-клітинами, CD154-опосередкованої активації ДК шляхом оцінювання підвищеної поверхневої експресії CD80 і/або CD86, або секреції цитокінів клітинами ДК, або активації сигнальних шляхів CD40 шляхом оцінювання в аналізах репортерного гена, наприклад шляхом вимірювання секреції секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) клітинами, які експресують SEAP під керуванням NF-κВ-індуцибельного промотора.

Термін «вектор» означає полінуклеотид, який здатний до дублювання в біологічній системі або який можна перемістити між такими системами. Полінуклеотиди вектора, як правило, містять елементи, такі як точки початку реплікації, сигнал поліаденілювання або маркери селекції, які функціонують для полегшення дублювання або підтримання даних полінуклеотидів у біологічній системі. Приклади таких біологічних систем можуть включати клітину, вірус,



тварину, рослину й відновлені біологічні системи, що використовують біологічні компоненти, здатні дублювати вектор. Полінуклеотид, який містить вектор, може бути молекулою ДНК або РНК або їхнім гібридом.

Термін «експресійний вектор» означає вектор, який можна використати в біологічній системі або у відновленій біологічній системі для спрямування трансляції поліпептиду, кодованого полінуклеотидною послідовністю, присутньою в експресійному векторі.

Термін «полінуклеотид» означає молекулу, яка містить ланцюг нуклеотидів, ковалентно зв'язаних між собою цукор-фосфатним основним ланцюгом або іншим еквівалентним ковалентним хімічним зв'язком. Типовими прикладами полінуклеотидів є дво- й одноланцюгові ДНК і РНК.

Термін «поліпептид» або «білок» означає молекулу, яка містить принаймні два амінокислотні залишки, зв'язані пептидним зв'язком з утворенням поліпептиду. Малі поліпептиди, що містять менш ніж 50 амінокислот, можна називати «пептидами».

У цьому документі вживаються загальноприйняті однолітерні або трилітерні коди амінокислот, як показано в таблиці 1.

Таблиця 1

Амінокислота	Трилітерний код	Однолітерний код
Аланін	Ala	A
Аргінін	Arg	R
Аспарагін	Asn	N
Аспартат	Asp	D
Цистеїн	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамін	Glu	Q
Гліцин	Gly	G
Гістидин	His	H
Ізолейцин	Ile	I
Лізин	Lys	K
Метіонін	Met	M
Фенілаланін	Phe	F
Пролін	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонін	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валін	Val	V

#### Композиції речовини

У цьому винаході запропоновані антагоністичні антитіла, які специфічно зв'язують CD154 із високою афінністю й ефективно нейтралізують біологічну активність CD154. Винахід ґрунтується, принаймні частково, на визначенні, яке суперечить існуючому розумінню того, що зв'язування антитіл, які специфічно зв'язують CD154, із FcγR1a на тромбоцитах, призводить до активації й агрегації тромбоцитів і подальшої тромбоемболії; у цьому винаході було виявлено, що активація тромбоцитів також залежить від епітопа CD154, з яким зв'язується антитіло. Було виявлено, що антитіла за цим винаходом, які зв'язують певний епітоп на CD154 і які здатні до взаємодії з FcγR1a, не опосередковують активацію тромбоцитів. Крім того, антитіла за цим винаходом необов'язково мають сконструйований Fc, щоб запобігти ініціюванню додаткових небажаних імуностимулюючих функцій. Таким чином, антитіла за цим винаходом можуть мати більш сприятливі профілі безпечності в клінічних умовах у порівнянні з існуючими антитілами, які специфічно зв'язують CD154.

CD154 є мішенню в аутоімунних реакціях, відторгненні трансплантата й інших імунних захворюваннях у мишей, приматів, які не являють собою людину (NHP), і в людей. У декількох клінічних дослідженнях фази II антитіла, які специфічно зв'язують CD154, продемонстрували ефективне блокування активностей CD154 in vivo і полегшення захворювання. Антагоністи CD154 відрізняються від усіх інших терапевтичних засобів своїм впливом на імунну відповідь; вони є єдиними терапевтичними засобами, які можуть індукувати функціональну імунологічну

толерантність, що продемонстровано як у мишей, так і в мавп. У мишей практично всі моделі аутоімунних захворювань можуть бути ефективно полегшені за допомогою антагоністів CD154 (Noelle et al., Ann N Y Acad Sci 815: 384–391, 1997; Mackey et al., J Leukoc Biol 63: 418–428, 1998; Noelle, Agents Actions Suppl 49: 17–22, 1998; Quezada et al., Annu Rev Immunol 22: 307–328, 2004), причому спостерігається довготривала ремісія.

У винаході запропоновано виділене антагоністичне антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154 із SEQ ID NO: 1.

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154, причому CD154 являє собою гомотример, і антитіло зв'язує перший мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 182–207 CD154 і другий мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 176–253 CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

Прикладом такого антитіла є антитіло C4LB89. Оскільки варіабельні області антитіл C4LB235 і C4LB236 відрізняються одним амінокислотним залишком у LCDR2 порівняно з такими в C4LB89, і оскільки C4LB231 і C4LB232 мають ідентичні послідовності VH/VL із C4LB89, очікується, що ці антитіла також зв'язуватимуть той самий епітоп CD154, що й C4LB89. Антитіла, які зв'язують CD154 у межах залишків 182–207 і 176–253, не здатні активувати тромбоцити, навіть якщо вони здатні взаємодіяти з FcγR, включно з FcγRIIa. Таким чином, ці антитіла можуть мати покращений профіль безпечності порівняно з іншими антагоністичними антитілами, які специфічно зв'язують CD154.

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154 людини з SEQ ID NO: 1, які містять область, що визначає комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) і HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), де необов'язково

залишок S1 у HCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T або V;  
залишок I4 у HCDR1 піддається мутації на M, L або V;  
залишок S5 у HCDR1 піддається мутації на A;  
залишок S3 у HCDR2 піддається мутації на A, T або V;  
залишок P4 у HCDR2 піддається мутації на V, T, L Q або E;  
залишок N8 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або

Y;  
залишок T9 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y;  
залишок N10 у HCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W

або Y;

залишок S1 у HCDR3 піддається мутації на A або M;  
залишок R2 у HCDR3 піддається мутації на A, S, Q або K; і  
залишок L7 у HCDR3 піддається мутації на M.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить область, що визначає комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), де необов'язково

залишок Q4 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W або Y;

залишок S5 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

залишок S7 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

залишок S8 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

залишок A2 у LCDR2 піддається мутації на S;  
залишок N3 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y;

залишок S4 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

залишок L5 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W або Y;

залишок Q6 у LCDR2 піддається мутації на E, D або N;  
залишок S7 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

залишок S3 у LCDR3 піддається мутації на A;

залишок D4 у LCDR3 піддається мутації на N;  
залишок S5 у LCDR3 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y; і

залишок I6 у LCDR3 піддається мутації на A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T або V.

Кристалічна структура комплексу антитіл C4LB89 і CD154 показала, що антитіло зв'язує CD154 тільки залишками VH. Додаткові аналізи показали, що певні заміщення в CDR антитіла, показані в таблиці 19 і таблиці 20, як вказано вище, за прогнозами не впливають на загальну структуру комплексу, а, отже, і на характеристики антитіла.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить область, що визначає комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1, LCDR2 і LCDR3 із

SEQ ID NO: 36, 43 і 51 відповідно;

SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно;

SEQ ID NO: 38, 45 і 53 відповідно;

SEQ ID NO: 39, 46 і 54 відповідно;

SEQ ID NO: 40, 47 і 55 відповідно;

SEQ ID NO: 41, 47 і 56 відповідно;

SEQ ID NO: 42, 48 і 57 відповідно;

SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно; або

SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 44 і 52 відповідно.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 49 і 52 відповідно.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 50 і 52 відповідно.

У деяких варіантах втілення імунний комплекс антитіла за цим винаходом і розчинного CD154 людини (shCD154) не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією Р-селектину на поверхні тромбоцитів.

Активація тромбоцитів є добре відомим процесом, який перетворює гладкий неадгезивний тромбоцит на липку частку з нерівною поверхнею, яка вивільняє й експресує біологічно активні речовини й набуває здатності зв'язувати білок плазми фібриноген. Активація може також виникати в результаті фізичного подразника високої напруги зсуву рідини, наприклад, виявленого на місці критичного звуження артерій (Quinn et al., 2005, Platelet Function: assessment, diagnosis, and treatment, Humana Press, pp. 3–20). Активація тромбоцитів призводить до активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що призводить до посилення експресії Р-селектину на поверхні тромбоцитів і збільшення афінності зв'язування фібриногену з рецепторами інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . Таким чином, активацію тромбоцитів можна виміряти шляхом вимірювання підвищеної поверхневої експресії Р-селектину або зв'язування зонд-ліганду, наприклад PAC-1, з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  на тромбоцитах із використанням, наприклад, проточної цитометрії. Антитіла за цим винаходом не активують тромбоцити людини, якщо антитіло в комплексі з shCD154 не підвищує поверхневу експресію Р-селектину або не збільшує зв'язування зонд-ліганду (наприклад, PAC-1) з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  статистично значущим чином порівняно з поверхневою експресією Р-селектину й збільшенням зв'язування зонд-ліганду (наприклад, PAC-1) з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , індукованими shCD154.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом має принаймні одну з наступних властивостей:

зв'язується з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 за температури 25 °C у фосфатно-сольовому буферному розчині Дульбекко (ДФБР), який містить 0,03 % полісорбату Р20 і 100 мкг/мл альбуміну бичачої сироватки;

інгібує опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $\text{IC}_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

інгібує опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $\text{IC}_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $5 \times$

$10^{-10}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $5 \times 10^{-11}$  М або менше або приблизно  $1 \times 10^{-11}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло, яке специфічно зв'язує CD154, перехресно реагує з CD154 *Macaca fascicularis* (яванського макака) або з CD154 *Callithrix jacchus* (мавпи-ігрунки).

Афінність антитіл до CD154 людини, яванського макака або мавпи-ігрунки можна визначити експериментально з використанням будь-якого відповідного способу. У таких способах можуть застосовуватися вимірювальні прилади ProteOn XPR36, Biacore 3000 або KinExA, аналізи ELISA або аналізи конкурентного зв'язування, відомі фахівцям у цій галузі. Виміряна афінність конкретного антитіла до CD154 може змінюватися, якщо її вимірюють у різних умовах (наприклад, осмолярність, рівень pH). Таким чином, вимірювання афінності й інших параметрів зв'язування (наприклад,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) зазвичай проводять зі стандартними умовами та стандартизованим буфером, такими як буфер, описаний у цьому документі. Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що внутрішня помилка під час вимірювання афінності, наприклад, із використанням Biacore 3000 або Proteon (вимірюється як стандартне відхилення, CV), зазвичай може перебувати в межах 5–33 % для вимірювань у типових межах виявлення. Таким чином, термін «приблизно» відображає типове стандартне відхилення в аналізі. Наприклад, типове CV для  $K_D$   $1 \times 10^{-9}$  М становить до  $\pm 0,33 \times 10^{-9}$  М.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом інгібує CD154-опосередковану проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше.

В аналізі проліферації В-клітин можна культивувати  $1 \times 10^5$  В-клітин мигдалеподібних залоз людини зі 100 нг/мл рекомбінантного IL-21 людини, 0,5 мкг/мл тримерного рекомбінантного розчинного CD154 людини, який експресується як гібридний білок «лейцинової застібки», і антитіло до CD154 у діапазоні концентрацій 0,000064–25 мкг/мл у кінцевому об'ємі 200 мкл/ямка. Після 2 днів інкубації до культури можна додавати метил (-3H)-тимідин (0,5 мкКі/ямка) і після інкубування протягом однієї ночі визначати вплив антитіл на проліферацію В-клітин людини.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом інгібує індуковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом інгібує індуковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного IFN- $\beta$  мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $IC_{50}$  від приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М до  $5,4 \times 10^{-10}$  М.

Можна використовувати такі клітини, як, наприклад HEK-Blue™ CD40L (InvivoGen, м. Сан-Дієго, штат Каліфорнія, США). CD154 людини можуть бути забезпечені у вигляді тримерного розчинного гібридного білка «лейцинової застібки» CD154. Можна виявити сигнал від секретованої лужної фосфатази й розрахувати значення  $IC_{50}$  для інгібування з використанням добре відомих способів.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує перший мономер CD154 і другий мономер CD154 у гомотримері CD154 одночасно.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує принаймні один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або вісім залишків CD154 у першому мономері CD154 у межах амінокислотних залишків 182–207 CD154 із SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує принаймні один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або вісім залишків CD154 у другому мономері CD154 у межах амінокислотних залишків 176–253 CD154 із SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує залишки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 і R207 у першому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує залишки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F253 у другому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

Термін «у межах» означає, що антитіло зв'язує тільки залишки всередині інтервалів амінокислот 182–207, 176–354 або 182–207 і 176–354.

Прикладом такого антитіла є антитіло C4LB89. Оскільки варіабельні області антитіл C4LB235 і C4LB236 відрізняються одним амінокислотним залишком у LCDR2 порівняно з такими в C4LB89, і оскільки C4LB231 і C4LB232 мають ідентичні послідовності VH/VL із C4LB89, очікується, що ці антитіла також зв'язуватимуть той самий епітоп CD154, що й C4LB89.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом зв'язує CD154 людини паратопними залишками, які знаходяться у VH антитіла.

«Паратопний залишок» являє собою залишок у VH або VL антитіла, який знаходиться у межах 4 Å від залишків CD154. Паратопні залишки можуть бути ідентифіковані з кристалічних структур комплексу антитіла з CD154.

Ілюстративне антитіло, яке зв'язує CD154 тільки паратопними залишками VH і в якому VL не контактують з антигеном, являє собою антитіло, яке містить VH і VL антитіла C4LB89. Оскільки варіабельні області C4LB235 і C4LB236 відрізняються одним амінокислотним залишком у LCDR2 порівняно з такими в C4LB89, і оскільки C4LB231 і C4LB232 мають ідентичні послідовності VH/VL із C4LB89, очікується, що ці антитіла також зв'язуватимуть CD154 тільки залишками VH. Антитіла, які зв'язують CD154 у межах залишків 182–207 або 176–354 SEQ ID NO: 1 або залишків E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 і R207 у першому мономері CD154 і залишків T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F253 у другому мономері CD154 у гомотримері CD154, нездатні активувати тромбоцити, навіть якщо вони здатні взаємодіяти з FcγR, включно з FcγRIIa. Таким чином, ці антитіла можуть мати покращену безпечність порівняно з іншими антитілами, які специфічно зв'язують CD154.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 59, причому VH необов'язково містить одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) із SEQ ID NO: 59.

Антитіло, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно або має HCDR із VH із SEQ ID NO: 59 або VH із SEQ ID NO: 59, зв'язує CD154 тільки за допомогою VH антитіла. Таким чином, VH із SEQ ID NO: 59 або VH, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно, може поєднуватися з будь-якою послідовністю варіабельної області легкого ланцюга (VL), і зв'язування отриманого антитіла з CD154 можна дослідити з використанням аналізів, описаних у цьому документі, щоб створити антитіло, яке специфічно зв'язує CD154.

Наприклад, VH, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно, або VH із SEQ ID NO: 59 можна використовувати для скринінгу доменів VL, здатних утворювати дводоменний специфічний антигензв'язуючий фрагмент, здатний зв'язуватися з CD154. Скринінг можна здійснити за допомогою способів скринінгу фагового дисплея з використанням, наприклад, комбінаторного ієрархічного подвійного підходу, розкритого в публікації PCT № WO1992/01047. У цьому підході використовують окрему колонію, яка містить клон H- або L-ланцюга, наприклад VH із SEQ ID NO: 59, для інфікування повної бібліотеки клонів, що кодуєть інші ланцюги (L або H), і отриманий специфічний до двох ланцюгів антигензв'язуючий домен вибирають відповідно до методик фагового дисплея, як описано в цьому документі, і досліджують на його зв'язування й антагоністичну активність щодо CD154.

Альтернативно VH із SEQ ID NO: 59 або VH, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно, може поєднуватися з доменами VL існуючих антитіл до CD154 або антитіл до CD154, описаних у цьому документі, і отримане антитіло досліджують на його зв'язування й антагоністичну активність щодо CD154.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73, причому VL необов'язково містить одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) із SEQ ID NO: 66, 72 або 73, причому VL необов'язково містить одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить принаймні одне заміщення в області Fc, причому антитіло не активує тромбоцити людини.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом має знижене зв'язування з FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa або FcγRIIIb.

5 Термін «знижене зв'язування» стосується зниженого зв'язування антитіла за цим винаходом, яке має принаймні одне заміщення в області Fc, з рецептором FcγR порівняно зі зв'язуванням батьківського антитіла без заміщення з тим самим рецептором FcγR. Знижене зв'язування може являти собою зв'язування, знижене принаймні приблизно в 100 разів, принаймні приблизно в 500 разів, принаймні приблизно в 1000 разів, принаймні приблизно в 5000 разів, принаймні приблизно в 10 000 разів або принаймні приблизно в 20 000 разів. На практиці антитіла, що демонструють «знижене зв'язування» з конкретним FcγR, належать до антитіл, які мають статистично незначущу ефекторну функцію, опосередковану конкретним FcγR.

15 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить принаймні одне заміщення в області Fc.

У деяких варіантах втілення принаймні одне заміщення в області Fc являє собою заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S або P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

20 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S або P331S у області Fc, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

У деяких варіантах втілення принаймні одне заміщення в області Fc являє собою заміщення V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E H268A, V309L, A330S або P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

25 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S у області Fc, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло або його антигензв'язуюча ділянку, які специфічно зв'язуються з CD154 із SEQ ID NO: 1, що містять важкий ланцюг із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.

30 У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло або його антигензв'язуюча ділянку, які специфічно зв'язуються з CD154 із SEQ ID NO: 1, що містять важкий ланцюг із SEQ ID NO: 82 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло або його антигензв'язуюча ділянку, які специфічно зв'язуються з CD154 із SEQ ID NO: 1, що містять важкий ланцюг із SEQ ID NO: 83 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.

35 SEQ ID NO: 80 (VH C4LB89 на IgG1sigma: C4LB231 HC)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTNYAQK  
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYGDLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA  
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ  
40 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS  
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81 (легкий ланцюг C4LB89 і C4LB231)  
45 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYANSL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 82 (VH C4LB89 на IgG1sigmaYTE)  
50 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTNYAQK  
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYGDLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA  
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGASSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV  
DVSAEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS  
55 SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 83 (VH C4LB89 на IgG2sigma)  
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPIFGNTNYAQK  
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYGDLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA  
60 PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQ

TYTCNVNDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS  
AEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Імунні ефекторні властивості антитіл за цим винаходом можна посилювати або пригнічувати через Fc-модифікації за допомогою методик, відомих фахівцям у цій галузі. Наприклад, Fc-ефекторні функції, такі як зв'язування C1q, комплементзалежна цитотоксичність (CDC), антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC), фагоцитоз, негативна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора; BCR) тощо можна реалізувати й/або контролювати шляхом модифікацій залишків у Fc, що відповідає за ці види активності. Наприклад, в антитіла за цим винаходом можуть бути введені Fc-заміщення V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 або V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S (міжнародна патентна публікація № WO11/066501) або L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S.

Зв'язування антитіл за цим винаходом із FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa і FcγRIIIb можна оцінити з використанням рекомбінантних розчинних форм або пов'язаних із клітиною форм рецепторів Fcγ. Наприклад, вимірювання прямого або непрямого, тобто конкурентного, зв'язування, можуть бути застосовані для оцінки відносних показників афінності й авідності антитіл за цим винаходом до різних FcγR. В ілюстративному аналізі зв'язування досліджуваного антитіла з розчинним FcγR, іммобілізованим на планшеті, оцінюють із використанням конкурентного зв'язування між 1 мкг/мл біотинільованого IgG1 людини й серійними розведеннями досліджуваного антитіла, попередньо введенного в комплекс із антигеном.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом має знижену антитілозалежну клітинну цитотоксичність (АЗКЦ), антитілозалежний клітинний фагоцитоз (АЗКФ) і/або комплементзалежну цитотоксичність (КЗЦ).

«Антитілозалежна клітинна цитотоксичність», «антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність» або «АЗКЦ» є механізмом індукції загибелі клітин, який залежить від взаємодії покритих антитілами клітин-мішеней з ефекторними клітинами, які мають літичну активність, такими як природні клітини-кілери, моноцити, макрофаги й нейтрофіли, через Fc-гамма-рецептори (FcγR), що експресуються на ефекторних клітинах. Наприклад, НК-клітини експресують рецептор FcγRIIIa, тоді як моноцити експресують рецептори FcγRI, FcγRII і FcγRIIIa. Для оцінки активності АЗКЦ антитіл за цим винаходом антитіло можна додавати до клітин-мішеней у комбінації з імунними ефекторними клітинами, які можуть бути активовані комплексами антиген-антитіло, що призводить до цитолізу клітини-мішені. Зазвичай цитоліз виявляють за вивільненням із лізованих клітин мітки (наприклад, радіоактивних субстратів, флуоресцентних барвників або природних внутрішньоклітинних білків). Приклади ефекторних клітин для таких аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і ПК-клітини. Приклади клітин-мішеней включають клітини D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™) або T-клітини, що експресують CD154.

«Антитілозалежний клітинний фагоцитоз» (АЗКФ) стосується механізму видалення покритих антитілами клітин-мішеней шляхом поглинання фагоцитарними клітинами, такими як макрофаги або дендритні клітини. АЗКФ можна оцінити з використанням як ефекторних клітин макрофагів, отриманих із моноцитів, а як клітин-мішеней — клітин D1.1 Jurkat, що експресують CD154, створених із можливістю експресії зеленого флуоресцентного білка (GFP) або іншої міченої молекули. Співвідношення ефекторні клітини : клітини-мішені може становити, наприклад, 4 : 1. Ефекторні клітини можна інкубувати з клітинами-мішенями протягом 4 годин із досліджуванням антитілом до CD154 або без нього. Після інкубації клітини можна відокремити з використанням акутази. Макрофаги можуть бути ідентифіковані з використанням антитіл до CD11b і CD14, зв'язаних із флуоресцентною міткою, а відсоток фагоцитозу можна визначати на основі % флуоресценції GFP у макрофагах CD11<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> з використанням стандартних способів.

«Комплементзалежна цитотоксичність» або «КЗЦ» стосується механізму індукції загибелі клітин, у якому Fc-ефекторний домен антитіла, зв'язаного з мішенню, зв'язується з компонентом C1q комплементу й активує його, що, у свою чергу, активує каскад комплементу, призводячи до загибелі клітини-мішені. Активація комплементу може також призвести до відкладення компонентів комплементу на поверхні клітини-мішені, що полегшує АЗКЦ шляхом зв'язування рецепторів комплементу (наприклад, CR3) на лейкоцитах. КЗЦ клітин, що експресують CD154, можна виміряти, наприклад, шляхом висівання клітин Jurkat у відповідне середовище, додавання до суміші антитіл до CD154 з наступним додаванням об'єднаної людської сироватки. Після періоду інкубації відсоткову долю (%) лізованих клітин можна визначити як % клітин, забарвлених йодидом пропідію, в аналізі FACS із використанням стандартних способів.

Терміни «знижена АЗКЦ», «знижена КЗЦ» і «знижена АЗКФ» стосуються індукованої антитілом АЗКЦ, КЗЦ і/або АЗКФ, що є статистично незначущими в стандартних аналізах, у яких вимірюють АЗКЦ, КЗЦ і/або АЗКФ, таких як аналізи, описані в цьому документі, і в аналізах, описаних у патенті США № 8,871,204.

Антитіла за цим винаходом з бажаною афінністю й профілем нейтралізації, можна вибрати з бібліотек різновидів або фрагментів шляхом пенінгу («просіювання») із CD154 людини або CD154 мавпи-ігрунки й необов'язково шляхом додаткового дозрівання афінності антитіла. В ілюстративному циклі пенінгу фагові бібліотеки можна піддавати пенінгу з CD154 мавпи-ігрунки. Альтернативно антитіла за цим винаходом можна створювати шляхом імунізації мишей за допомогою CD154 людини, або CD154 мавпи-ігрунки, або обома, і проводити скринінг гібридом на зв'язування з CD154 людини й подальше оцінювання антагоністичних властивостей антитіл із використанням способів, описаних у цьому документі.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом конкурує за зв'язування з CD154 з антитілом, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.

Конкуренцію між специфічним зв'язуванням із CD154 антитілом за цим винаходом, які містять певні послідовності VH і VL, можна досліджувати *in vitro* з використанням добре відомих способів. Наприклад, зв'язування антитіла, міченого NHS-естером MSD Sulfo-Tag™, із CD154 за присутності неміченого антитіла можна оцінити за допомогою аналізів ELISA або Bioacore, або, щоб продемонструвати конкуренцію з антитілами за цим винаходом, можна використати проточну цитометрію. Антитіло конкурує за зв'язування з CD154 з еталонним антитілом (тобто антитілом, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66), якщо антитіло інгібує зв'язування еталонного антитіла з CD154 на 80 % або більше, наприклад на 85 % або більше, 90 % або більше або 95 % або більше.

У деяких варіантах втілення VH із SEQ ID NO: 59 можна об'єднувати з VL будь-якого з антитіл до CD154, описаних у міжнародних патентних публікаціях № WO1993/08207, WO1994/10308, WO1996/40918, WO1993/009812, WO1999/051258, WO1995/006480, WO1995/006481, WO1995/006666, WO2001/002057, WO1997/017446, WO1999/012566, WO2001/068860, WO2005/003175, WO2006/033702, WO2006/030220, WO2008/118356, WO2012/052205, WO2012/138768, WO2012/138768, WO2013/055745 і WO2013/056068, для створення антагоністичного антитіла до CD154. Зв'язувальну й антагоністичну активність отриманих антитіл можна дослідити з використанням аналізів і протоколів, описаних у цьому документі.

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із

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

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, що містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із

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



У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 22 і 29 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 36, 43 і 51 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 58 і VL із SEQ ID NO: 65.

5 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 24 і 31 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 38, 45 і 53 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 60 і VL із SEQ ID NO: 67.

10 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 18, 25 і 32 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 39, 46 і 54 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 61 і VL із SEQ ID NO: 68.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 19, 26 і 33 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 40, 47 і 55 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 62 і VL із SEQ ID NO: 69.

15 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 20, 27 і 34 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 41, 47 і 56 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 63 і VL із SEQ ID NO: 70.

20 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 21, 28 і 35 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 42, 48 і 57 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 64 і VL із SEQ ID NO: 71.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72.

25 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно; або VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH і VL, причому VH містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64.

30 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH і VL, причому VL містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64 і VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73.

35 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 VH із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73 і амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3 VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73, де CDR визначені відповідно до Kabat, Chothia і/або IMG.

Різновиди антитіл за цим винаходом, які містять амінокислотні послідовності VH або VL, наведені в таблиці 8, таблиці 9 і таблиці 14, перебувають у межах обсягу цього винаходу. Наприклад, різновиди можуть містити одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень у VH і/або VL, які не чинять негативного впливу на властивості антитіла. У деяких варіантах втілення ідентичність послідовності може становити приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % амінокислотної послідовності VH або VL за цим винаходом.

Відсоток ідентичності між двома послідовностями залежить від кількості ідентичних положень, загальних для послідовностей (тобто % ідентичності = кількість ідентичних положень / загальна кількість положень x 100), з урахуванням кількості гепів і довжини кожного гепу, який необхідно ввести для оптимального вирівнювання двох послідовностей.

50 Відсоток ідентичності між двома амінокислотними послідовностями можна визначити з використанням алгоритму E. Meyers і W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11–17 (1988)), який був введений у програму ALIGN (версія 2.0) з використанням таблиці «ваги» залишків PAM120, штрафу за продовження гепу 12 і штрафу за геп 4. Крім того, відсоток ідентичності між двома амінокислотними послідовностями можна визначити з використанням алгоритму Needleman і Wunsch, описаного в публікації (J. Mol. Biol. 48:444–453 (1970)), який був уведений у програму GAP у програмному забезпеченні GCG (доступне за інтернет-адресою [http://\\_www\\_gcg\\_com](http://_www_gcg_com)), з використанням матриці Blossum 62 або матриці PAM250 і «вагою» гепу 16, 14, 12, 10, 8, 6, або 4 і «вагою» за продовження гепу 1, 2, 3, 4, 5 або 6.

60 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO:

58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64, причому антитіло демонструє одну або більше з наступних властивостей:

імунний комплекс антитіла й shCD154 не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією P-селектину на поверхні тромбоцитів;

зв'язується з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1;

інгібує опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

інгібує опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF-κB-індуцибельного інтерферон-β (IFN-β) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VL, що є принаймні на 90 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73, причому антитіло демонструє одну або більше з наступних властивостей:

імунний комплекс антитіла й shCD154 не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією P-селектину на поверхні тромбоцитів;

зв'язується з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1;

інгібує опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

інгібує опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF-κB-індуцибельного інтерферон-β (IFN-β) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64, і VL що є принаймні на 90 %, 90 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73, причому антитіло демонструє одну або більше з наступних властивостей:

імунний комплекс антитіла й shCD154 не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією P-селектину на поверхні тромбоцитів;

зв'язується з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1;

інгібує опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

інгібує опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF-κB-індуцибельного інтерферон-β (IFN-β) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини, зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 58.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 59.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 60.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 61.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 62.



п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3, наведені в таблиці 8, таблиці 9 і таблиці 14, або їхні консервативні модифікації, причому антитіла зберігають бажані функціональні властивості антагоністичних антитіл, що специфічно зв'язують CD154.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 22 і 29 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 24 і 31 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 18, 25 і 32 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 19, 26 і 33 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 20, 27 і 34 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 21, 28 і 35 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 36, 43 і 51 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 38, 45 і 53 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 39, 46 і 54 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 40, 47 і 55 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 41, 47 і 56 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 42, 48 і 57 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно і їхні консервативні модифікації.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно і їхні консервативні модифікації.

Антитіла за цим винаходом, що містять певні послідовності HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 і їхні консервативні модифікації,

демонструють одну або більше з наступних властивостей:

імунний комплекс антитіла й shCD154 не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією Р-селектину на поверхні тромбоцитів;

зв'язуються з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1;

інгібують опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

інгібують опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

Термін «консервативна модифікація» стосується модифікацій амінокислот, які не мають значущого впливу або які не змінюють характеристики зв'язування антитіла, що містить амінокислотні послідовності. Консервативні модифікації включають амінокислотні заміщення, додавання й делеції. Консервативні заміщення являють собою такі заміщення, у яких амінокислота замінюється амінокислотним залишком з аналогічним бічним ланцюгом. Сімейства амінокислотних залишків, які мають подібні бічні ланцюги, є добре визначеними й включають амінокислоти з кислими бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту), основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин, триптофан), ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, фенілаланін, триптофан, гістидин, тирозин), аліфатичними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, серин, треонін), амідними (наприклад, аспарагін, глутамін), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та сірковмісними бічними ланцюгами (цистеїн, метіонін). Крім того, будь-який нативний залишок у поліпептиді також можна замінити аланіном, як описано вище, для аланін-сканувального мутагенезу (MacLennan et al., *Act Physiol. Scand. Suppl.* 643:55–67, 1998; Sasaki et al., *Adv. Biophys.* 35:1–24, 1998). Амінокислотні заміщення в антитілах винаходу можуть бути виконані добре відомими способами, наприклад шляхом ПЛР-мутагенезу (патент США № 4,683,195). Альтернативно, бібліотеки різновидів можна отримувати з використанням відомих способів, наприклад із використанням випадкових (NNK) або не випадкових кодонів, наприклад DVK-кодонів, які кодують 11 амінокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики отриманих різновидів антитіл можна визначити з використанням аналізів, описаних у цьому документі.

Хоча варіанти втілення, проілюстровані в цих прикладах, містять пари варіабельних областей, одну з важкого ланцюга й одну з легкого ланцюга, фахівцеві в цій галузі буде зрозуміло, що альтернативні варіанти втілення можуть містити єдину варіабельну область важкого або легкого ланцюга. Єдину варіабельну область можна використовувати для скринінгу на варіабельні домени, здатні формувати специфічний щодо двох доменів антигензв'язуючий фрагмент, який здатен, наприклад, специфічно зв'язуватися з CD154. Скринінг можна здійснити за допомогою способів скринінгу фагового дисплея з використанням, наприклад, комбінаторного ієрархічного подвійного підходу, розкритого в міжнародній патентній публікації № WO1992/01047, як описано в цьому документі.

Антитіла за цим винаходом можна створювати з використанням різноманітних методик. Наприклад, для створення моноклональних антитіл можна використовувати гібридомний спосіб Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975. У гібридомному способі мишу або іншу тварину-хазяїна, таку як хом'як, щур або мавпа, імунізують за допомогою CD154 людини, мавпи-ігрунки або яванського макака або фрагментами CD154, наприклад розчинними формами CD154, із подальшим злиттям клітин селезінки імунізованих тварин із мієломними клітинами з використанням стандартних способів для отримання гібридомних клітин (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59–103 (Academic Press, 1986)). Проводять скринінг колоній, що утворюються з одиночних імутилізованих гібридомних клітин, на продукування антитіл із бажаними властивостями, такими як специфічність зв'язування, перехресна реактивність (або їх відсутність) і афінність до антигена.

Для отримання антитіл за цим винаходом можна використовувати різноманітних тварин-хазяїнів. Наприклад, для створення антитіл можна використовувати мишей лінії Balb/c. Антитіла, отримані в мишах Balb/c і інших тваринах, відмінних від людини, можна гуманізувати з використанням різноманітних технологій для створення більшої кількості послідовностей, подібних до людських. Типові методи гуманізації, включаючи відбір каркасів людських акцепторів, є відомими і включають CDR-щеплення (патент США № 5,225,539), SDR-щеплення (патент США № 6,818,749), технологію зміни поверхні (Palin, *Mol Immunol* 28:489–499, 1991), зміну поверхні залишків, що визначають специфічність (SDR) (публікація патенту США № 20100261620), адаптації для людини (або адаптація до каркаса людського походження) (публікація патенту США № US2009/0118127), супергуманізації (патент США № 7,709,226) і керованої селекції (Osbourne et al (2005) *Methods* 36:61–68, 2005; патент США № 5,565,332). У цих способах CDR вихідних антитіл переносять на людські каркаси, які можуть бути вибрані на основі їхньої загальної гомології з батьківськими каркасами, ґрунтуючись на інформації про довжину, гомологію або канонічну структуру CDR каркаса, або їх комбінацію.

Гуманізовані антитіла можна додатково оптимізувати для покращення їхньої селективності або афінності до бажаного антигена шляхом включення змінених залишків підтримки каркаса

для збереження афінності зв'язування (зворотні мутації) за допомогою методик, таких як ті, що розкриті й описані в міжнародній патентній публікації № WO90/007861 і в міжнародній патентній публікації № WO92/22653, або шляхом введення різновидів у будь-яку з CDR для покращення, наприклад, афінності антитіла.

Трансгенних мишей, що несуть людські локуси імуноглобулінів (Ig) у своєму геномі, можна використовувати для генерування людських антитіл проти білка-мішені, і це описано, наприклад, у міжнародній патентній публікації № WO90/04036, патенті США № 6150584, міжнародній патентній публікації № WO99/45962, міжнародній патентній публікації № WO02/066630, міжнародній патентній публікації № WO02/43478, Lonberg et al (1994) Nature 368:856–9; Green et al (1994) Nature Genet. 7:13–21; Green & Jakobovits (1998) Exp. Med. 188:483–95; Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65–93; Bruggemann et al (1991) Eur. J. Immunol. 21:1323–1326; Fishwild et al (1996) Nat. Biotechnol. 14:845–851; Mendez et al (1997) Nat. Genet. 15:146–156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11–23; Yang et al (1999) Cancer Res. 59:1236–1243; Bruggemann and Taussig (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:455–458; міжнародній патентній публікації № WO02/043478). Ендогенні локуси імуноглобулінів у таких мишей можна зруйнувати або видалити, і можна вставити в геном миші принаймні один повний або частковий локус людського імуноглобуліну з використанням гомологічної або негомологічної рекомбінації з використанням трансхромосом або з використанням мінігенів. Для отримання людських антитіл, спрямованих проти вибраного антигена, з використанням технології, описаної вище, можна залучати такі компанії, як Regeneron ([http://\\_www\\_regeneron\\_com](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_harbourantibodies\\_com](http://_www_harbourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) і Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)).

Людські антитіла можна вибирати з бібліотеки фагового дисплея, де фаг сконструйовано для експресії імуноглобулінів людини або їхніх ділянок, таких як Fab, одноланцюгові антитіла (scFv) або неспарені або спарені варіабельні області антитіл (Knappik et al., J.Mol Biol 296:57–86, 2000; Krebs et al., J Immunol Meth 254:67–84, 2001; Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309–314, 1996; Sheets et al., PITAS (USA) 95:6157–6162, 1998; Hoogenboom and Winter, J Mol Biol 227:381, 1991; Marks et al., J Mol Biol 222:581, 1991). Антитіла згідно з винаходом можна виділити, наприклад, із бібліотеки фагового дисплея, що експресує варіабельні області важкого й легкого ланцюгів антитіла як гібридні білки з білком оболонки рІХ бактеріофага, як описано в публікації Shi et al., J Mol Biol 397:385–96, 2010 і міжнародній патентній публікації № WO09/085462). Можна провести скринінг бібліотек на зв'язування фага з CD154 людини, мавпи-ігрунки й/або яванського макака, а отримані позитивні клони можна додатково охарактеризувати, виділити Fab із лізатів клонів і експресувати як повнорозмірні IgG. Такі способи з використанням фагового дисплея для виділення людських антитіл описані, наприклад, у патентах США № 5,223,409; 5,403,484; і 5,571,698 авторів Ladner et al.; патентах США № 5,427,908 і 5,580,717 авторів Dower et al.; патентах США № 5,969,108 і 6,172,197 авторів McCafferty et al.; і патентах США № 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 і 6,593,081 авторів Griffiths et al.

Підготовку імуногенних антигенів і отримання моноклонального антитіла можна виконати з використанням будь-якого відповідного способу, такого як отримання рекомбінантного білка. Імуногенні антигени можна вводити тварині у формі очищеного білка або сумішей білків, включаючи цілі клітини або екстракти клітин або тканин, або антиген можна отримати de novo у тілі тварини з нуклеїнових кислот, що кодують указаний антиген або його ділянку.

Антитіла за цим винаходом можуть бути людськими або гуманізованими.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить каркас VH, отриманий із гена зародкової лінії людини VH1\_1–69, VH4\_4–39, VH1\_1-02 або VH4\_4-59.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом містить каркас VL, отриманий із гена зародкової лінії людини VKIV\_B3, VKI\_O12 або VL3\_3R.

Антитіла за цим винаходом можуть бути антитілами типу IgA, IgD, IgE, IgG або IgM. Антитіла за цим винаходом можуть бути антитілами типу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Антитіла за цим винаходом можуть бути додатково сконструйовані для створення модифікованого антитіла з аналогічними або зміненими властивостями порівняно з батьківським антитілом. В антитілах за цим винаходом можуть бути сконструйовані VH, VL, VH і VL, константні області, каркас VH, каркас VL або всі без винятку з шести CDR.

Антитіла за цим винаходом можуть бути сконструйовані шляхом CDR-щеплення. Одну або більше CDR-послідовностей антитіла за цим винаходом можна прищепити до різних послідовностей каркаса. CDR-щеплення можуть бути виконані з використанням способів, описаних у цьому документі. У деяких варіантах втілення антитіла за цим винаходом містять

VH, яка містить HCDR1 із SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 або 21, HCDR2 із SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 або 28, HCDR3 із SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 або 35 і VL, яка містить LCDR1 із SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 або 42, LCDR2 із SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 або 50 і/або LCDR3 із SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55, 56 або 57, причому каркас VH отримано не з VH1\_1–69, VH4\_4–39, VH1\_1–02 або VH4\_4–59, а каркас VL отримано не з VKIV\_B3, VKI\_O12 або VL3\_3R. Каркасні послідовності, які слід використовувати, можуть бути отримані з публічних баз даних ДНК або опублікованих посилань, які включають послідовності генів антитіл зародкової лінії. Наприклад, ДНК зародкової лінії й кодовані білкові послідовності для гена варіабельної області легкого й важкого ланцюгів людини можна знайти в базі даних міжнародної інформаційної системи IMGT®, International ImMunoGeneTics information system® <http://www.imgt.org>. Каркасні послідовності, які можуть бути використані для заміни існуючих каркасних послідовностей у антитілах за цим винаходом, являють собою ті, що демонструють найвищу відсоткову ідентичність до C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 і C4LB256.

Каркасні послідовності батьківських і сконструйованих антитіл можуть бути додатково модифіковані, наприклад шляхом зворотних мутацій, для відновлення й/або покращення зв'язування отриманого антитіла з антигеном, як описано, наприклад, у патенті США № 6,180,370. Каркасні послідовності батьківських і сконструйованих антитіл можуть бути додатково модифіковані шляхом мутації одного або декількох залишків у межах каркасної області, або навіть у межах однієї або декількох областей CDR для видалення Т-клітинних епітопів, щоб таким чином знизити потенційну імуногенність антитіла. Цей підхід також називається «деімунізацією» і більш докладно описаний у публікації патенту США № 20030153043.

Залишки CDR антитіл за цим винаходом можуть бути піддані мутації для покращення однієї або більше властивостей зв'язування антитіла, що становить інтерес. Для введення мутації (-ій) може бути здійснений сайт-спрямований мутагенез або ПЛР-опосередкований мутагенез, і вплив на зв'язування антитіла або іншу функціональну властивість, що становить інтерес, може бути оцінений у аналізах *in vitro* або *in vivo*, як описано в цьому документі й запропоновано в прикладах. Прикладами заміщень, які можуть бути введені, є консервативні модифікації, як описано вище. Крім того, зазвичай змінюється не більш ніж один, два, три, чотири або п'ять залишків у області CDR.

Для модуляції періоду напівжиття антитіла в антитілі за цим винаходом можуть бути виконані заміщення Fc. Наприклад, для подовження періоду напівжиття отриманого антитіла може бути введене одне або більше заміщень M252Y, S254T і T256E (Dall'Acqua et al., J Biol Chem 281:23514–240, 2006).

Крім того, антитіла за цим винаходом можна модифікувати після трансляції за допомогою таких способів, як глікозилювання, ізомеризація, деглікозилювання або ковалентна модифікація, що не зустрічається в природі, наприклад доповнення функціональними групами поліетиленгліколю (пегілювання) і ліпідизація. Такі модифікації можуть відбуватись *in vivo* або *in vitro*. Наприклад, для покращення фармакокінетичних профілів антитіл такі антитіла згідно з винаходом можна кон'югувати з поліетиленгліколем (ПЕГілювати). Кон'югацію можна здійснити за допомогою методів, відомих фахівцям у цій галузі. Було продемонстровано, що кон'югація терапевтичних антитіл із ПЕГ покращує фармакодинаміку без погіршення функції (Knigh et al., Platelets 15:409–18, 2004; Leong et al., Cytokine 16:106–19, 2001; Yang et al., Protein Eng. 16:761–70, 2003).

Антитіла або їхні фрагменти за цим винаходом, модифіковані для підвищення стабільності, селективності, перехресної реактивності, афінності, імуногенності або іншої бажаної біологічної або біофізичної властивості, перебувають у рамках цього винаходу. Стабільність антитіла залежить від низки факторів, включаючи (1) пакування ядра окремих доменів, що впливає на їхню внутрішню стабільність, (2) взаємодії на межі поділу між білками, які впливають на спарювання HC і LC, (3) запас полярних і заряджених залишків, (4) мережу водневих зв'язків полярних і заряджених залишків; і (5) розподіл поверхневих зарядів і полярних залишків серед інших внутрішньо- і міжмолекулярних сил (Worn et al., J Mol Biol 305:989–1010, 2001). Залишки, які мають потенціал для дестабілізації структур, можна ідентифікувати на основі кристалічної структури антитіла або, у певних випадках, молекулярного моделювання, а вплив залишків на стабільність антитіла можна проаналізувати шляхом створення й оцінки різновидів, які несуть мутації в ідентифікованих залишках. Одним зі шляхів підвищення стабільності антитіла є підвищення середньої точки температурного переходу ( $T_m$ ), яку вимірюють за допомогою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК). Загалом  $T_m$  білка корелює з його стабільністю й зворотно корелює з його схильністю до розгортання й денатурації в розчині й процесами деградації, які залежать від схильності білка до розгортання (Remmele et al., Biopharm 13:36–46,

2000). У ряді досліджень виявлено кореляцію між розподілом за фізичною стабільністю композицій, виміряною як термічна стабільність за допомогою ДСК, і фізичною стабільністю, виміряною за допомогою інших способів (Gupta et al., AAPS PharmSci 5E8, 2003; Zhang et al., J Pharm Sci 93:3076–89, 2004; Maa et al., Int J Pharm 140:155–68, 1996; Bedu-Addo et al., Pharm Res 21:1353–61, 2004; Remmele et al., Pharm Res 15:200–8, 1997). Дослідження композицій показують, що  $T_m$  Fab впливає на довготривалу фізичну стабільність відповідного mAb.

У деяких варіантах втілення антитіла за цим винаходом являє собою біспецифічне антитіло.

У деяких варіантах втілення антитіла за цим винаходом являє собою мультиспецифічне антитіло.

Моноспецифічні антитіла, які специфічно зв'язують CD154 за цим винаходом, можуть бути сконструйовані у формі біспецифічних антитіл, які також включено в обсяг цього винаходу. Області VL і/або VH антитіл згідно з винаходом можна сконструювати з використанням опублікованих способів у формі одноланцюгових біспецифічних антитіл, таких як структури конструкцій TandAb® (міжнародна патентна публікація № WO1999/57150; публікація патенту США № 2011/0206672) або у формі біспецифічних scFVs, таких як структури, розкриті в патенті США № 5,869,620; міжнародній патентній публікації № WO1995/15388, міжнародній патентній публікації № WO1997/14719 або міжнародній патентній публікації № WO2011/036460.

Області VL і/або VH антитіл згідно з винаходом можна сконструювати у формі біспецифічних повнорозмірних антитіл, де кожне плече антитіла зв'язує певний антиген або епітоп. Такі біспецифічні антитіла можна створити шляхом модуляції взаємодій СН3 між важкими ланцюгами двох антитіл з отриманням біспецифічних антитіл з використанням методик, таких як ті, що описані в патенті США № 7,695,936; міжнародній патентній публікації № WO2004/111233; публікації патенту США № 2010/0015133; публікації патенту США № 2007/0287170; міжнародній патентній публікації № WO2008/119353; публікації патенту США № 2009/0182127; публікації патенту США № 2010/0286374; публікації патенту США № 2011/0123532; міжнародній патентній публікації № WO2011/131746; міжнародній патентній публікації № WO2011/143545; або публікації патенту США № 2012/0149876.

Наприклад, біспецифічні антитіла можна отримувати *in vitro* у безклітинному середовищі шляхом введення асиметричних мутацій у області СН3 двох моноспецифічних гомодимерних антитіл і утворення біспецифічного гетеродимерного антитіла з двох батьківських моноспецифічних гомодимерних антитіл у відновних умовах, щоб забезпечити ізомеризацію дисульфідного зв'язку відповідно до способів, описаних у міжнародній патентній публікації № WO2011/131746. У способах конструюють два моноспецифічні двовалентні антитіла так, щоб вони мали певні заміщення в домені СН3, які сприяють стабільності гетеродимера; антитіла інкубують разом у відновних умовах, необхідних для забезпечення ізомеризації дисульфідного зв'язку в залишках цистеїну в шарнірній ділянці; таким чином створюють біспецифічне антитіло шляхом обміну Fab-плечей. Умови інкубації оптимально можуть бути відновлені до невідновних. Прикладами відновлювальних агентів, що можуть використовуватися, є 2-меркаптоетиламін (2-MEA), дитіотреїтол (DTT), дитіоеритритол (DTE), глутатіон, трис(2-карбоксіетил)фосфін (TCPEP), L-цистеїн і бета-меркаптоетанол, переважно відновлювальний агент вибирають із групи, що складається з: 2-меркаптоетиламіну, дитіотреїтолу й трис(2-карбоксіетил)фосфіну. Наприклад, можна використовувати інкубування протягом принаймні 90 хв за температури принаймні 20 °C за присутності принаймні 25 mM 2-MEA або за присутності принаймні 0,5 mM дитіотреїтолу за pH у діапазоні 5–8, наприклад за pH 7,0 або за pH 7,4.

Прикладами мутацій в області СН3, які можна використовувати в першому важкому ланцюзі й у другому важкому ланцюзі біспецифічного антитіла, є K409R і/або F405L.

Додатковими біспецифічними структурами, у які можна вбудувати області VL і/або VH антитіл за цим винаходом, є, наприклад, імуноглобуліни з подвійним варіабельним доменом (DVD) (міжнародна патентна публікація № WO2009/134776) або структури, які включають різноманітні димеризаційні домени для поєднання двох плечей антитіла з відмінною специфічністю, такі як «лейцинова застібка» або колагенові димеризаційні домени (міжнародна патентна публікація № WO2012/022811, патент США № 5,932,448; патент США № 6,833,441). DVD — це повнорозмірні антитіла, які містять важкий ланцюг зі структурою VH1–лінкер–VH2–CH і легкий ланцюг зі структурою VL1–лінкер–VL2–CL; де лінкер є необов'язковим.

У винаході також запропоновано антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, що має певні послідовності VH і VL, причому VH антитіла кодується першим полінуклеотидом, а VL антитіла кодується другим синтетичним полінуклеотидом. Полінуклеотид може являти собою комплементарну дезоксинуклеїнову кислоту (кДНК) і може бути кодон-оптимізованим для експресії у відповідному хазяїні. Оптимізація кодонів є добре відомою технологією.



У деяких варіантах втілення полінуклеотида, які кодують VH або VL антитіла за цим винаходом, містять послідовності SEQ ID NO: 76, 77, 78 або 79.

SEQ ID NO: 76 (які кодують VH C4LB231)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACC  
ATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC  
AAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCAACAGCCTGCAGAGCGGCGTGGCCAGCAGATTC  
AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTC  
GCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCGACAGCATCCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTG  
GAAATCAAG

SEQ ID NO: 77 (які кодують VL C4LB231)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTG  
TCCTGCAAGGCCAGCGGCGGCACCTTCAGCAGCTACGGCATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCCCA  
GGACAGGGCTGGAAATGGATGGGCTGGATCAGCCCCATCTTCGGCAACACCAACTACGCCAG  
AAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACGAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGT  
AGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGCCGGTACTACGGCGAC  
CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCT

SEQ ID NO: 78 (які кодують VH C4LB191)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTG  
AAGAAACCTGGCGCCAGCATGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACT  
ACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGACTGGAATGGGTGGGACGGTTCAACCCCA  
ACAGCGGCGACACCAACGGCGCCAGAAATTCAGGGCAGAGTGACCATGACCCGGGACACCA  
GCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTACCCGGCTGCGGAGCGACGACACCGCCGTGTACCACT  
GTGCCAGAGAGGGCGAGCTGGCCGGCATCTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGTGTGA  
CAGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 79 (які кодують VL C4LB191)

AGCTACGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCCGTGTCTCCTGGCCAGACCGCCAGCATCA  
CCTGTAGCGGCGACAAGCTGGGCGACAAATACGTGTCTGGAACCACCAGAAGCCCGGCCAGA  
GCCCCGTGCTGGTGTATCTACCAGGACCGGAAGAGGCCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTCAGCG  
GCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCATGGACGAGGCC  
GACTACTACTGCCAGGCCTGGGACAGCAGCACCGTGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACC  
GTGCTG

У винаході також запропоновано виділений полінуклеотид, який кодує будь-які варіабельні області важкого ланцюга антитіла, варіабельні області легкого ланцюга антитіла, важкі ланцюги антитіла й/або легкі ланцюги антитіла за цим винаходом. Певні типи полінуклеотиди розкрито в цьому документі, однак інші полінуклеотиди, які, враховуючи виродженість генетичного коду або переваги кодонів у цій системі експресії, кодують антитіла згідно з винаходом, також перебувають в рамках цього винаходу. Прикладами полінуклеотидів є, наприклад, полінуклеотиди, які мають послідовності, наведені в SEQ ID NO: 76, 77, 78 і 79. Полінуклеотидні послідовності, що кодують VH або VL (або їхній фрагмент) антитіла за цим винаходом, можна функціонально пов'язати з одним або декількома регуляторними елементами, такими як промотор і енхансер, що забезпечує експресію нуклеотидної послідовності в призначеній для цього клітині-хазяїні. Полінуклеотидом може бути кДНК.

У винаході також запропоновано вектор, що містить полінуклеотид за цим винаходом. Такі вектори можуть бути плазмідними векторами, вірусними векторами, векторами для експресії бакуловірусів, векторами на основі транспозона або будь-якими іншими векторами, придатними для введення синтетичного полінуклеотиду цього винаходу в певний організм або генетичне середовище за допомогою будь-яких засобів. Наприклад, полінуклеотиди, що кодують варіабельні області легкого й/або важкого ланцюгів антитіла за цим винаходом, необов'язково зв'язані з константними областями, вставляють у експресійні вектори. Легкі й важкі ланцюги можуть бути клоновані в однакові або різні експресійні вектори. Сегменти ДНК, що кодують ланцюги імуноглобулінів, можуть бути функціонально пов'язані з регуляторними послідовностями в експресійному (-их) векторі (-ах), що забезпечують експресію поліпептидів імуноглобуліну. Такі регуляторні послідовності включають сигнальні послідовності, промотори (наприклад, природні або гетерологічні промотори), елементи-енхансери й послідовності завершення транскрипції, і їх вибирають, щоб вони були сумісними з клітиною-хазяїном, вибраною для експресії антитіла. Після введення вектора у відповідного хазяїна цього хазяїна утримують в умовах, що підходять для високого рівня експресії білків, які кодуються введеними полінуклеотидами.

Відповідні експресійні вектори звичайно здатні до реплікації в організмах-хазяїнах як епісоми або як невід'ємна частина хромосомної ДНК хазяїна. Звичайно експресійні вектори

містять селективні маркери, наприклад, резистентності до ампіциліну, резистентності до гігromіцину, резистентності до тетрацикліну, резистентності до канаміцину або резистентності до неоміцину, щоб дозволити виявлення клітин, трансформованих бажаними послідовностями ДНК.

Відповідні промотори й енхансерні елементи відомі в цій галузі. Для експресії в еукаріотичній клітині типові промотори включають промотор і енхансерний елемент гена легкого і/або важкого ланцюга імуноглобуліну; безпосередній ранній промотор цитомегаловірусів; промотор тимідинкінази вірусу простого герпесу; ранній і пізній промотори SV40; промотор, присутній у довгих кінцевих повторах ретровірусу; промотор металотіонеїну-I миші; і різноманітні відомі в цій галузі тканиноспецифічні промотори. Вибір відповідного вектора й промотора перебуває в межах рівня звичайного фахівця у цій галузі.

Фахівцями в цій галузі відома значна кількість відповідних векторів і промоторів; багато з них є комерційно доступними для отримання рекомбінантних конструкцій, що є предметом обговорення. Наступні вектори пропонуються як приклад. Бактеріальні: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, м. Ла-Хойя, штат Каліфорнія, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 і pRIT5 (Pharmacia, м. Упсала, Швеція). Еукаріотичні: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG і pSVL (Pharmacia).

У винаході також запропоновано клітину-хазяїна, що містить один або більше векторів за цим винаходом. Термін «клітина-хазяїн» стосується клітини, у яку ввели вектор. Зрозуміло, що термін «клітина-хазяїн» призначений для позначення не тільки конкретної клітини, що є предметом обговорення, але й потомства такої клітини, а також стабільної клітинної лінії, утвореної з конкретної клітини, що є предметом обговорення. Оскільки в наступних поколіннях можуть відбутися деякі модифікації внаслідок або мутації, або впливів навколишнього середовища, таке потомство може не бути ідентичним вихідній клітині, але все ще буде включене в рамки терміна «клітина-хазяїн», що використовується в цьому документі. Такі клітини-хазяїни можуть бути еукаріотичними клітинами, прокаріотичними клітинами, рослинними клітинами або клітинами архей.

Прикладами прокаріотичних клітин-хазяїнів є *Escherichia coli*, бацили, такі як *Bacillus subtilis*, і інші ентеробактерії, такі як *Salmonella*, *Serratia* і різноманітні види *Pseudomonas*. Для експресії також підходять інші мікроорганізми, такі як дріжджі. Прикладами відповідних дріжджових клітин-хазяїнів є *Saccharomyces* (наприклад, *S. cerevisiae*) і *Pichia*. Типовими еукаріотичними клітинами є клітини ссавців, комах, птахів або інші клітини тваринного походження. Еукаріотичні клітини ссавців включають іморталізовані клітинні лінії, такі як гібридами або лінії клітин мієломи, такі як мишачі клітинні лінії SP2/0 (Американська колекція типових культур (ATCC), м. Манассас, штат Вірджинія, США CRL-1581), NS0 (Європейська колекція культур клітин (ECACC), м. Солсбері, графство Вілтшир, Великобританія, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) і Ag653 (ATCC CRL-1580). Типовою лінією клітин мієломи людини є U266 (ATCC CRL-TIB-196). Інші придатні клітинні лінії включають отримані з яєчника китайського хом'яка (CHO), такі як CHO-K1SV (Lonza Biologics, м. Вокерсвіль, штат Меріленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) або DG44.

У винаході також запропоновано спосіб отримання антитіла за цим винаходом, який включає культивування клітини-хазяїна за цим винаходом в умовах, за яких відбувається експресія антитіла, і виділення антитіла, виробленого клітиною-хазяїном. Способи отримання антитіла і їхнього очищення добре відомі в цій галузі. Після синтезу (або хімічного, або рекомбінантного) цілі антитіла, їхні димери, окремі легкі й/або важкі ланцюги або інші фрагменти антитіла, такі як VH й/або VL, можна очистити відповідно до стандартних процедур, включаючи преципітацію сульфатом амонію, афінні колонки, колонкову хроматографію, очищення високоефективною рідинною хроматографією (BEPX), гель-електрофорез тощо (див. загалом Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Антитіло, яке є предметом обговорення, може бути по суті чистим, наприклад, чистим на принаймні від приблизно 80 % до 85 %, чистим на принаймні від приблизно 85 % до 90 %, чистим на принаймні від приблизно 90 % до 95 %, чистим на принаймні від приблизно 98 % до 99 % або більше, наприклад вільним від забруднюючих речовин, таких як клітинний детрит, макромолекули тощо, крім антитіла, яке є предметом обговорення.

У винаході також запропоновано спосіб отримання антагоністичного антитіла, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, який включає:

вбудовування в експресійний вектор першого полінуклеотиду, що кодує VH антитіла, і другого полінуклеотиду, що кодує VL антитіла;

трансформацію клітини-хазяїна за допомогою експресійного вектора;

культивування клітини-хазяїна в культуральному середовищі в умовах, за яких VL і VH експресуються й формують антитіло; і

виділення антитіла з клітини-хазяїна або культурального середовища.

Полінуклеотиди, які кодують певні послідовності VH або VL за цим винаходом, можна вбудовувати у вектори з використанням стандартних способів молекулярної біології. Трансформацію клітини-хазяїна, культивування, експресію антитіла й очищення виконують із використанням добре відомих способів.

Способи лікування

Антагоністичні антитіла за цим винаходом, які специфічно зв'язують CD154, наприклад антитіла C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 і C4LB236, можна використовувати для лікування й/або профілактики будь-якого стану або захворювання, для яких антагонізм впливів CD154 може бути терапевтично ефективним і може зменшувати симптоми захворювання. Приклади включають лікування алергічних, аутоімунних, онкологічних, трансплантаційних, РТПХ, запальних і інших станів, особливо тих станів, де терапевтично бажаними є індукція толерантності й/або пригнічення гуморального імунітету. Захворювання, які можна лікувати антитілами за цим винаходом, являють собою імуноопосередковані запальні захворювання або аутоімунні захворювання, такі як артрит, системний червоний вовчак (СЧВ), запальне захворювання кишечника, трансплантація, трансплантація нирок, трансплантація шкіри, трансплантація кісткового мозку, реакція «трансплантат проти хазяїна» (РТПХ), імунна тромбоцитопенічна пурпура (ІТП), розсіяний склероз, тиреоїдит, цукровий діабет I типу або атеросклероз.

Крім простого блокування взаємодій CD154-CD40, терапія антитілами до CD154 призводить до стимулювання імунологічної толерантності (Gordon et al., Diabetes 47: 1199–1206, 1988); Markees et al., Transplantation 64: 329–335, 1997; Jarvinen et al., Transplantation 76: 1375–1379, 2003; Quezada et al., Blood 102: 1920–1926, 2003; Frlita et al., J Immunother 26: 72–84, 2003; Elster et al., Transplantation 72: 1473–1478, 2001; Benda et al., Cell Transplantation 11: 715–720, 2002; Wekerle and Sykes, Annual review of medicine 2001. 52: 353–370<sup>19</sup>; Camirand et al., Transplantation 73: 453–461, 2002).

У винаході також запропоновано спосіб лікування імуноопосередкованого запального захворювання або аутоімунного захворювання, який включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом суб'єктові, який цього потребує, протягом часу, достатнього для лікування імуноопосередкованого запального захворювання або аутоімунного захворювання.

У винаході також запропоновано спосіб лікування артриту, який включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом суб'єктові, який цього потребує, протягом часу, достатнього для лікування артриту.

У деяких варіантах втілення артрит являє собою ювенільний артрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, синдром Рейтера, анкілозивний спондилоартрит або подагричний артрит.

У винаході також запропоновано спосіб лікування вовчака, який включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом суб'єктові, який цього потребує, протягом часу, достатнього для лікування вовчака.

У деяких варіантах втілення вовчак являє собою системний червоний вовчак (СЧВ) або шкірний червоний вовчак (ШЧВ).

У деяких варіантах втілення суб'єкт має вовчаковий нефрит.

У винаході також запропоновано спосіб лікування запального захворювання кишечника, який включає введення терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом суб'єктові, який цього потребує, протягом часу, достатнього для лікування запального захворювання кишечника.

У деяких варіантах втілення запальне захворювання кишечника являє собою хворобу Крона.

У деяких варіантах втілення запальне захворювання кишечника являє собою виразковий коліт.

Терміни «лікування» або «лікувати» стосуються терапевтичного лікування. Особи, які потребують лікування, включають тих суб'єктів, у кого вже діагностовано порушення або симптом порушення. Суб'єкти, яких можна лікувати, також включають тих, хто схильний або вразливий до порушення, із тих, у кого порушення підлягає профілактиці. Сприятливі або бажані клінічні результати включають полегшення симптомів, зменшення ступеня захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання, затримку або вповільнення прогресування захворювання, покращення або тимчасове полегшення стану захворювання й ремісію (часткову або повну), які можна виявити або не можна виявити. Сприятливий клінічний результат у суб'єкта, який отримав лікування, включає, наприклад, зниження проліферації В-

клітин або дендритних клітин, зниження рівня запальних цитокінів, молекул адгезії, протеаз, імуноглобулінів (у тих випадках, коли клітина-носіє CD40 є В-клітиною), їх комбінацій, збільшення продукування протизапальних білків, зменшення кількості аутореактивних клітин, збільшення імунної толерантності, інгібування виживання аутореактивних клітин і/або зменшення одного або більше симптомів, опосередкованих стимулюванням CD154 клітин, що експресують CD40.

Клінічну відповідь можна оцінити з використанням скринінгових методик, таких як магнітно-резонансна томографія (МРТ), рентгенографічна візуалізація, комп'ютерна томографія (КТ), проточна цитометрія або аналіз сортування клітин з активованою флуоресценцією (FACS), гістологічне дослідження, макропатологічне дослідження, біохімічне дослідження крові, включаючи, серед іншого, зміни, які виявляються за допомогою аналізів ELISA, RIA, хроматографії тощо.

Приклади антитіл, які можна використовувати в способах за цим винаходом, включають області VH, VL, HCDR і/або LCDR, які показано в таблиці 2, таблиці 3, таблиці 4, таблиці 5, таблиці 6, таблиці 7, таблиці 8, таблиці 9, таблиці 13 і таблиці 14, і антитіла C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199, C4LB231, C4LB232, C4LB35 і C4LB236.

Способи цього винаходу можна використовувати для лікування суб'єктів, які належать до будь-якої класифікації тварин. Приклади суб'єктів, яких можна лікувати, включають ссавців, таких як люди, гризуни, собаки, кішки й свійські тварини.

Антитіла за цим винаходом можуть бути корисні у виготовленні лікарського засобу для такого лікування, де лікарський засіб готують для введення в дозах, визначених у даному документі.

Антитіла за цим винаходом можна вводити в комбінації з другим терапевтичним агентом.

Другий терапевтичний агент може бути будь-яким відомим видом терапії аутоімунних і запальних захворювань, включно з будь-яким агентом або комбінацією агентів, які, як відомо, придатні або які використовувалися або наразі використовуються для лікування аутоімунних і запальних захворювань. Такі види терапії і терапевтичних агентів включають хірургічне втручання або проведення хірургічної процедури (наприклад, спленектомії, лімфаденектомії, тиреоїдектомії, плазмаферезу, лейкофореzu, трансплантації клітин, тканини або органа, процедур на кишечнику, перфузії органів тощо), променеvu терапію, терапію стероїдними терапевтичними засобами й нестероїдними терапевтичними засобами, гормональну терапію, терапію цитокінами, терапію дерматологічними агентами (наприклад, агентами для місцевого застосування, що використовуються для лікування захворювань шкіри, таких як алергія, контактний дерматит і псоріаз), імунодепресивну терапію й іншу терапію протизапальними моноклональними антитілами.

Другий терапевтичний агент може являти собою кортикостероїд, протималарійний лікарський засіб, імунодепресант, цитотоксичний лікарський засіб або В-клітинний модулятор.

У деяких варіантах втілення другий терапевтичний агент являє собою преднізон, преднізолон, метилпреднізолон, дефлазкорт, гідроксихлорохін, азатіоприн, метотрексат, циклофосфамід, мікофенолат мофетилу (MMF), мікофенолат натрію, циклоспорин, лефлуномід, такролімус, RITUXAN® (ритуксимаб) або BENLYSTA® (белімуаб).

У деяких варіантах втілення антитіла за цим винаходом вводять у комбінації з другим терапевтичним агентом. Ілюстративні другі терапевтичні агенти являють собою кортикостероїди, нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), саліцилати, гідроксихлорохін, сульфасалазин, цитотоксичні лікарські засоби, імунодепресанти, імуномодулюючі антитіла, метотрексат, циклофосфамід, мізорибін, хлорамбуцил, циклоспорин, такролімус (FK506; ProGrafrM), мікофенолат мофетилу й азатіоприн (6-меркаптопурин), сиролімус (рапаміцин), дезоксиспергуалін, лефлуномід і його малонітриламідні аналоги; антитіла до CTLA4 і злиття Ig, стимулюючі антитіла до В-лімфоцитів (наприклад, LYMPHOSTAT-BTM) і злиття CTLA4-Ig (BLyS-Ig), антитіла до CD80, антитіла до Т-клітин, такі як антитіло до CD3 (ОКТ3), антитіло до CD4, кортикостероїди, такі як, наприклад, клобетазол, галобетазол, гідрокортизон, триамцинолон, бетаметазон, флуоцинол, флуоцинонід, преднізон, преднізолон, метилпреднізолон; нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), такі як, наприклад, сульфасалазин, лікарські засоби, що містять мезаламін (відомі як агенти 5-ASA), цефексиксид, диклофенак, етодолак, фенпрофен, флурбіпрофен, ібупрофен, кетопрофен, меклофамат, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксaproзин, піроксикам, рофекоксид, саліцилати, суліндак і толметин; інгібітори фосфодіестерази-4, антитіла до TNF $\alpha$  REMICADE® (інфліксимаб), SIMPONI® (голімуаб) і HUMIRA® (адалімуаб), талідомід або його аналоги, такі як леналідомід.

Антитіла за цим винаходом можна вводити в комбінації з другим терапевтичним агентом одночасно, послідовно або окремо.

Ефективність лікування РА може бути оцінена з використанням ефективності, яка вимірюється за клінічними відповідями, критеріями, визначеними Американською колегією ревматологів, критеріями, визначеними Європейською протиревматичною лігою або іншими критеріями. Див., наприклад, Felson et al. (1995) *Arthritis Rheum.* 38 : 727–35 і van Gestel et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39: 34–40.

#### Введення/фармацевтичні композиції

У винаході запропоновано фармацевтичні композиції, які містять антагоністичні антитіла, що специфічно зв'язують CD154 за цим винаходом, і фармацевтично прийнятний носій. Для терапевтичного застосування антитіла за цим винаходом можна отримати у вигляді фармацевтичних композицій, що містять ефективну кількість антитіла як активного інгредієнта у фармацевтично прийнятному носії. Термін «носій» означає розріджувач, ад'ювант, наповнювач або носій, з яким вводять активну сполуку. Такі носії можуть бути рідинами, такими як вода й олії, у тому числі олії з нафти, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія тощо. Наприклад, можна використовувати 0,4 % фізіологічний розчин і 0,3 % гліцин. Ці розчини повинні бути стерильними й не містити жодних твердих частинок. Їх можна стерилізувати за допомогою загальноприйнятих, добре відомих способів стерилізації (наприклад, шляхом фільтрації). Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як агенти, що коригують рН, і буферні агенти, стабілізуючі агенти, загущувачі, ковзні агенти й барвники тощо. Концентрація молекул або антитіл згідно з цим винаходом у такій фармацевтичній композиції може змінюватися в широких межах, тобто від менш ніж приблизно 0,5 %, звичайно до принаймні приблизно 1 %, навіть до 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % або 50 % за масою, і буде вибрана в першу чергу виходячи з необхідної дози, об'ємів рідини, в'язкості тощо залежно від вибраного конкретного способу введення. Відповідні носії й композиції включно з іншими білками людини, наприклад сироватковим альбуміном людини, описані, наприклад, у публікації Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691–1092, див. особливо pp. 958–989.

Спосіб введення антитіл за цим винаходом у способах винаходу може бути будь-яким відповідним способом, таким як парентеральне введення, наприклад внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне або підшкірне, через слизові оболонки (пероральне, інтраназальне, інтравагінальне, ректальне), або іншими засобами, визнаними фахівцями й добре відомими в цій галузі.

Антитіла за цим винаходом можна вводити суб'єктові будь-яким відповідним способом, наприклад парентерально шляхом внутрішньовенної (в/в) інфузії або болюсної ін'єкції, внутрішньом'язово або підшкірно, або внутрішньоочеревинно. Внутрішньовенну (в/в) інфузію можна, наприклад, вводити протягом 15, 30, 60, 90, 120, 180 або 240 хвилин або впродовж 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 годин.

Доза, яку вводять суб'єктові з імуноопосередкованим запальним захворюванням або аутоімунним захворюванням, таким як ревматоїдний артрит, є достатньою, щоб полегшити або принаймні частково зупинити захворювання, що підлягає лікуванню («терапевтично ефективна кількість»), і може іноді становити від 0,005 мг/кг до приблизно 100 мг/кг, наприклад від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 20 мг/кг, або від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 20 мг/кг, або від приблизно 1 мг до приблизно 20 мг/кг, або приблизно 4 мг/кг, приблизно 8 мг/кг, приблизно 16 мг/кг або приблизно 24 мг/кг, або, наприклад, приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мг/кг, але може бути навіть вищою, наприклад приблизно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мг/кг.

Можна також вводити фіксовану одиничну дозу, наприклад 50, 100, 200, 500 або 1000 мг, або доза може ґрунтуватися на площі поверхні тіла пацієнта, наприклад становити 500, 400, 300, 250, 200 або 100 мг/м<sup>2</sup>. Зазвичай для лікування імуноопосередкованого запального захворювання, такого як ревматоїдний артрит, можна вводити від 1 до 8 доз (наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8), але можна вводити 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або більше доз.

Введення антитіл за цим винаходом можна повторювати через один день, два дні, три дні, чотири дні, п'ять днів, шість днів, один тиждень, два тижні, три тижні, один місяць, п'ять тижнів, шість тижнів, сім тижнів, два місяці, три місяці, чотири місяці, п'ять місяців, шість місяців або довше. Повторні курси лікування також можливі як довготривале введення. Повторне введення може бути в тій самій дозі або в іншій дозі. Наприклад, антитіла за цим винаходом можна

вводити в дозі 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 8 мг/кг або 16 мг/кг з інтервалом один тиждень протягом 8 тижнів з наступним введенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні два тижні протягом додаткових 16 тижнів з наступним введенням у дозі 8 мг/кг або 16 мг/кг кожні чотири тижні шляхом внутрішньовенної інфузії.

Антитіла за цим винаходом можуть бути запропоновані як підтримувальна терапія, яку вводять, наприклад, один раз на тиждень впродовж періоду 6 місяців або більше.

Наприклад, антитіла за цим винаходом можуть бути забезпечені у вигляді добової дози в кількості приблизно 0,1–100 мг/кг, наприклад 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мг/кг на добу принаймні в один із днів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 або, альтернативно, принаймні в один із тижнів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 після початку лікування (або в будь-якій комбінації перерахованого) із використанням одноразових або розділених доз кожні 24, 12, 8, 6, 4 або 2 години (або будь-якої комбінації перерахованого).

Антитіла за цим винаходом можна також вводити профілактично з метою зниження ризику розвитку імуноопосередкованого запального захворювання аутоімунного захворювання, такого як артрит або ревматоїдний артрит, і/або затримки початку імуноопосередкованого запального захворювання аутоімунного захворювання.

Таким чином, фармацевтичну композицію за цим винаходом для внутрішньом'язової ін'єкції можна приготувати так, щоб вона містила 1 мл стерильної буферної води й приблизно від 1 нг до приблизно 100 мг/кг, наприклад від приблизно 50 нг до приблизно 30 мг/кг, або більш переважно від приблизно 5 мг до приблизно 25 мг/кг антитіла за цим винаходом.

Наприклад, для введення пацієнтові з масою 80 кг можна приготувати фармацевтичну композицію з антитілами за цим винаходом для внутрішньовенної інфузії, яка містить приблизно 200 мл стерильного розчину Рінгера й від приблизно 8 мг до приблизно 2400 мг, від приблизно 400 мг до приблизно 1600 мг або від приблизно 400 мг до приблизно 800 мг антитіл за цим винаходом. Способи приготування композицій, які вводять парентерально, добре відомі й детальніше описані, наприклад, у «Remington's Pharmaceutical Science», 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

«Терапевтично ефективна кількість» антитіл за цим винаходом, що є ефективною для лікування імуноопосередкованого запального захворювання або аутоімунного захворювання, може бути визначена за допомогою стандартних методів дослідження. Наприклад, як допоміжний засіб для визначення оптимальних діапазонів дозування можна додатково використати аналізи *in vitro*. Необов'язково, дози антитіл за цим винаходом, що можуть бути ефективними для лікування імуноопосередкованого запального захворювання або аутоімунного захворювання, такого як артрит або ревматоїдний артрит, можна визначити шляхом введення антитіл відповідним тваринним моделям, відомим у цій галузі. Вибір конкретної ефективної дози можуть визначити фахівці в цій галузі (наприклад, шляхом клінічних досліджень) з урахуванням декількох чинників. Такі чинники включають захворювання, яке потрібно лікувати або попередити, пов'язані симптоми, маса тіла пацієнта, імунний статус пацієнта і інші фактори, відомі фахівцям у цій галузі. Точна доза для застосування в композиції буде також залежати від шляху введення й тяжкості захворювання, і її необхідно підбирати відповідно до оцінки лікаря, який проводить лікування, а також обставин для кожного пацієнта. Ефективні дози можна екстраполювати з кривих «доза-відповідь», отриманих із дослідних систем *in vitro* або тваринних моделей випробування. Антитіла згідно з винаходом можна тестувати на їхню ефективність і ефективну дозу з використанням будь-якої моделі, описаної в цьому документі.

Антитіла за цим винаходом можна ліофілізувати для зберігання й відновлювати у відповідному носії перед використанням. Доведено, що ця методика є ефективною під час використання звичайних білкових препаратів, і можна використовувати добре відомі методики ліофілізації й відновлення.

Антиідіотипічні антитіла

У цьому винаході запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке зв'язується з антитілом за цим винаходом.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 58 і VL із SEQ ID NO: 65.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 60 і VL із SEQ ID NO: 67.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 61 і VL із SEQ ID NO: 68.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 62 і VL із SEQ ID NO: 69.

5 У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 63 і VL із SEQ ID NO: 70.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 64 і VL із SEQ ID NO: 71.

10 У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72.

У винаході також запропоновано антиідіотипічне антитіло, яке специфічно зв'язує антитіло, що містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.

15 Антиідіотипічне (Id) антитіло являє собою антитіло, яке розпізнає антигенні детермінанти (наприклад, паратоп або CDR) антитіла. Id-антитіло може бути блокувальним щодо антигена або неблокувальним. Антиген-блокувальне Id-антитіло можна використовувати для виявлення вільного антитіла в зразку (наприклад, антитіла до CD154 за цим винаходом, описаного в цьому документі). Неблокувальне Id можна використовувати для виявлення сумарних антитіл (вільного, частково зв'язаного з антигеном або повністю зв'язаного з антигеном) у зразку. Id-антитіло можна отримати шляхом імунізації тварини антитілом, до якого готували антиідіотипічне антитіло.

20 Антиідіотипічне антитіло можна також використовувати як імуноген для індукування імунної відповіді в іншій тварини, з отриманням так званого антитіла до антиідіотипічного антитіла. Антитіло до антиідіотипічного антитіла може бути епітопно ідентичним вихідному mAb, що індукує антиідіотипічне антитіло. Таким чином, завдяки використанню антитіл до ідіотипічних детермінант mAb можливо ідентифікувати інші клони, що експресують антитіла з ідентичною специфічністю. Антиідіотипічні антитіла можна змінювати (таким чином отримуючи різновиди антиідіотипічних антитіл) і/або дериватизувати за допомогою будь-якої відповідної методики, як описано в тексті цього документа щодо антитіл, які специфічно зв'язують антитіла HLA-DR.

Імунокон'югати

30 Термін «імунокон'югат» стосується антитіла за цим винаходом, кон'югованого з однією або більше гетерологічних молекул.

У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом кон'юговане з одним або більше цитотоксичних агентів. Прикладами таких цитотоксичних агентів є хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, агенти, що інгібують ріст, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їхні фрагменти) і радіоактивні ізотопи.

40 У деяких варіантах втілення імунокон'югат являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), у якому антитіло за цим винаходом кон'юговане з одним або більше лікарськими засобами, такими як, майтанзиноїд (див., наприклад, патент США № 5,208,020, 5,416,06)); ауристин, наприклад фрагменти лікарського засобу монометилауристину DE і DF (MMAE і MMAF) (див., наприклад, патенти США № 5,635,483, 5,780,588, і 7,498,298), доластин, каліхеаміцин або їхні похідні (див., наприклад, патенти США № 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 і 5,877,296; Hinman et al., (1993) Cancer Res 53:3336–3342; і Lode et al., (1998) Cancer Res 58:2925–2928); антрациклін, наприклад дауноміцин або доксорубіцин (див., наприклад, Kratz et al., (2006) Current Med. Chem 13:477–523; Jeffrey et al., (2006) Bioorganic & Med Chem Letters 16:358–362; Torgov et al., (2005) Bioconj Chem 16:717–721; Nagy et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:829–834; Dubowchik et al, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529–1532 (2002); King et al., (2002) J Med Chem 45:4336–4343; і патент США № 6,630,579), метотрексат, віндезин, таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел і ортатаксел.

45 У деяких варіантах втілення імунокон'югат містить антитіло за цим винаходом, кон'юговане з ферментативно активним токсином або його фрагментом, таким як дифтерійний ланцюг А, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, ланцюг А екзотоксину (із *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор із *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор із *Saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени.

50 У деяких варіантах втілення антитіло за цим винаходом кон'юговане з радіоактивним атомом з утворенням радіокон'югата. Для одержання радіокон'югатів існує низка радіоактивних ізотопів. Приклади включають At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 і

радіоактивні ізопои Lu. У разі використання радіокон'югата для виявлення він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, <sup>99m</sup>Tc або <sup>1123</sup>Ln, або спінову мітку для ядерно-магнітно-резонансної (ЯМР) томографії (також відомої як магнітно-резонансна томографія, МРТ), таку як йод-<sup>123</sup>I, йод-<sup>131</sup>I, індій-<sup>111</sup>In, фтор-<sup>18</sup>F, вуглець-<sup>13</sup>C, азот-<sup>15</sup>N, кисень-<sup>17</sup>O, гадоліній, марганець або залізо

Кон'югати антитіла за винаходом і цитотоксичного агента одержують із використанням низки біфункціональних білок-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)-пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) імінотіолан (IT), біфункціональних похідних імідоестерів (таких як диметиладипімідат HQ), активних естерів (таких як дисукцинімідил суберат), альдегідів (таких як глутаральдегід), біс-азидо-сполук (таких як біс-(п-азидобензоїл) гександіамін), похідних біс-діазонію (таких як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанатів (таких як толуол 2,6-діізоціанат) і біс-активних сполук фтору (таких як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна одержати так, як описано в публікації Vitetta et al., (1987) Science 238: 1098. Мічена вуглець-<sup>14</sup>C-ізоціанатбензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатного агента для кон'югування радіонуклеотиду з антитілом. Див., наприклад, WO94/11026. Лінкер може бути представлений «розщеплюваним лінкером», що полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати лінкер, нестійкий до дії кислоти, лінкер, чутливий до дії пептидази, фотолабільний лінкер, диметилловий лінкер або дисульфід-вмісний лінкер (Chari et al., (1992) Cancer Res 52: 127–131; патент США № 5,208,020).

Імунокон'югати або ADC можуть бути отримані за допомогою реагентів, що сприяють утворенню перехресного зв'язку, таких як BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які доступні в продажу (наприклад, від компанії Pierce Biotechnology, Inc., м. Рокфорд, штат Іллінойс, США).

У винаході також запропоновано імунокон'югат, що містить антитіло, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1 за цим винаходом, зв'язаний із терапевтичним агентом або агентом для візуалізації.

Додаткові варіанти втілення винаходу

Нижче наведені деякі додаткові варіанти втілення винаходу відповідно до розкриття, наведеного в іншому місці цього опису. Наведені вище особливості варіантів втілення винаходу, які описані як такі, що відносяться до винаходу, розкритого в цьому документі, також відносяться до всіх без винятку цих додаткових пронумерованих варіантів втілення.

1) Виділене антагоністичне антитіло або його антигензв'язуюча ділянка, які специфічно зв'язують CD154 із SEQ ID NO: 1, які містять область, що визначає комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) і HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDLDY), де необов'язково

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

2) Антитіло за п. 1, яке містить область, що визначає комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT), де необов'язково

- a) залишок Q4 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W або Y;
- b) залишок S5 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;



с) залишок S7 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

д) залишок S8 у LCDR1 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

5 е) залишок A2 у LCDR2 піддається мутації на S;

ф) залишок N3 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W або Y;

г) залишок S4 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

10 h) залишок L5 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W або Y;

і) залишок Q6 у LCDR2 піддається мутації на E, D або N;

ж) залишок S7 у LCDR2 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y;

15 к) залишок S3 у LCDR3 піддається мутації на A;

л) залишок D4 у LCDR3 піддається мутації на N;

м) залишок S5 у LCDR3 піддається мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W або Y; і

н) залишок I6 у LCDR3 піддається мутації на A, C, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T, V.

20 3) Антитіло за варіантом втілення 1 або 2, яке містить HCDR1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WSPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

4) Антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1–3, яке містить

25 а) VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66; або

б) важкий ланцюг із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.

5) Виділене антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує розчинний CD154 людини (shCD154) із SEQ ID NO: 4.

6) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–5, яке містить принаймні одне заміщення в області Fc.

7) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–6, яке не активує людські тромбоцити.

8) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–7, яке зв'язується з shCD154 із константою дисоціації  $K_D$  приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $5 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $5 \times 10^{-11}$  М або менше, або приблизно  $1 \times 10^{-11}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1.

9) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–8, яке інгібує опосередковану shCD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  від приблизно  $7,0 \times 10^{-11}$  М до приблизно  $6 \times 10^{-10}$  М.

10) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–9, яке інгібує опосередковану shCD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF-кВ-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

11) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–10, яке конкурує за зв'язування з shCD154 з антитілом, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) і варіабельну область легкого ланцюга (VL), причому VH містить послідовність SEQ ID NO: 59 і VL містить послідовність SEQ ID NO: 66.

12) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–11, яке містить амінокислотні послідовності областей, що визначають комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) і 3 (HCDR3) із VH із SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64, які необов'язково містять одне, два або три консервативні амінокислотні заміщення в HCDR1, HCDR2 і/або HCDR3, причому HCDR визначені відповідно до Kabat, Chothia або IMGT.

13) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–12, яке містить амінокислотні послідовності областей, що визначають комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) і 3 (LCDR3) із VH із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73, які необов'язково містять одне, два або три консервативні амінокислотні заміщення в LCDR1, LCDR2 і/або LCDR3, причому LCDR визначені відповідно до Kabat, Chothia або IMGT.

14) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–13, яке містить амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із:

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

15) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–10, яке містить амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із:

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

16) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–15, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із:

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

17) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–16, яке містить LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із:

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

18) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 22 і 29 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 36, 43 і 51 відповідно.

19) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно.

20) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 16, 24 і 31 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 38, 45 і 53 відповідно.

21) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 18, 25 і 32 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 39, 46 і 54 відповідно.

22) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 19, 26 і 33 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 40, 47 і 55 відповідно.

23) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 20, 27 і 34 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 41, 47 і 56 відповідно.

24) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 21, 28 і 35 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 42, 48 і 57 відповідно.

25) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно.

26) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–17, яке містить HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно.

27) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–26, яке містить VH, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VH із SEQ ID NO: 58, 59, 60, 61, 62, 63 або 64.

28) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–27, яке містить VL, що є принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною VL із SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 або 73.

29) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 58 і VL із SEQ ID NO: 65, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

30) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

31) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 60 і VL із SEQ ID NO: 67, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

32) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 61 і VL із SEQ ID NO: 68, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

33) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 62 і VL із SEQ ID NO: 69, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

34) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 63 і VL із SEQ ID NO: 70, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

35) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 64 і VL із SEQ ID NO: 71, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

36) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72, причому VH, VL або і VH, і VL разом необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

37) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–28, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73, причому VH, VL або і VH, і VL необов'язково містять одне, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять, одинадцять, дванадцять, тринадцять, чотирнадцять або п'ятнадцять амінокислотних заміщень.

38) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–37, яке містить принаймні одне заміщення в області Fc.

39) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–38, у якому принаймні одне заміщення в області Fc являє собою заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

40) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–38, у якому принаймні одне заміщення в області Fc являє собою заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

41) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–40, яке належить до ізотипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

42) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–41, у якому всі паратопні залишки антитіла знаходяться у VH.

5 43) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–42, яке одночасно зв'язує перший мономер CD154 і другий мономер CD154 у розчинному тримері CD154 людини.

44) Антитіло за варіантом втілення 43, яке зв'язує принаймні один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або вісім залишків CD154 у першому мономері CD154 у межах амінокислотних залишків 182–207 CD154 із SEQ ID NO: 1, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

10 45) Антитіло за варіантом втілення 43 або 44, яке зв'язує принаймні один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім або вісім залишків CD154 у другому мономері CD154 у межах амінокислотних залишків 176–253 CD154 із SEQ ID NO: 1, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

46) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 43–45, яке зв'язує залишки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 і R207 у першому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

15 47) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 43–46, яке зв'язує залишки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F353 у другому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.

20 48) Біспецифічна молекула, яка містить антитіло або його антигензв'язуючу ділянку за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47, зв'язані з другою антигензв'язуючою молекулою, яка має відмінну специфічність зв'язування.

49) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47 або біспецифічна молекула за п. 48, які

- 25 а) не активують тромбоцити людини в імунному комплексі з shCD154;  
 б) зв'язуються з shCD154 із константою дисоціації  $K_D$  приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше;  
 в) інгібують опосередковану shCD154 проліферацію В-клітин людини; або  
 г) інгібують біологічну активність CD154 в аналізі репортерного гена, NF- $\kappa$ B-SEAP.

50) Імунокон'югат, який містить антитіло або його антигензв'язуючу ділянку за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47, зв'язані з терапевтичним агентом або з агентом для візуалізації.

30 51) Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1–47 і фармацевтично прийнятний носій.

52) Полінуклеотид, який кодує VH антитіла, VL антитіла або VH антитіла і VL антитіла за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47.

35 53) Вектор, який містить полінуклеотид за варіантом втілення 52.

54) Клітина-хазяїн, яка містить вектор за варіантом втілення 53.

55) Спосіб отримання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна за варіантом втілення 54 в умовах, за яких відбувається експресія антитіла, і виділення антитіла, виробленого в клітині-хазяїні.

40 56) Антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1–47 або фармацевтична композиція за варіантом втілення 51 для застосування в лікуванні аутоімунного захворювання або імуноопосередкованого запального захворювання.

45 57) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47 для застосування в лікуванні артриту, системного червоного вовчака (СЧВ), запального захворювання кишечника, трансплантації, трансплантації нирок, трансплантації шкіри, трансплантації кісткового мозку, реакції «трансплантат проти хазяїна» (РТПХ), імунної тромбоцитопенічної пурпури (ІТП), розсіяного склерозу, тиреоїдиту, цукрового діабету I типу або атеросклерозу.

58) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47 для застосування в лікуванні ревматоїдного артриту.

50 59) Антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1–47 для застосування в лікуванні вовчака.

60) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47 для застосування в лікуванні під час трансплантації.

61) Антитіло за будь-яким одним із варіантів втілення 1–47 для застосування в лікуванні запального захворювання кишечника.

55 62) Антитіло за будь-яким із варіантів втілення 1–47 для застосування за будь-яким із варіантів втілення 56–61 у комбінації з другим терапевтичним агентом.

63) Антитіло за варіантом втілення 62, у якому другий терапевтичний агент являє собою нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), саліцилати, гідроксихлорохін, сульфасалазин, кортикостероїди, цитотоксичні лікарські засоби, імунодепресанти й/або антитіла.

У винаході також запропоновано виділене антитіло або його антигензв'язуючу ділянку, які специфічно зв'язують CD154 людини з SEQ ID NO: 1, які містять область, що визначає комплементарність, важкого ланцюга (HCDR) 1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), область, що визначає комплементарність, легкого ланцюга (LCDR) 1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

У винаході також запропоновано виділене антагоністичне антитіло, яке специфічно зв'язує розчинний CD154 людини (shCD154) із SEQ ID NO: 4, що містить HCDR1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).

У деяких варіантах втілення антитіло містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.

У деяких варіантах втілення антитіло зв'язується з shCD154 із константою дисоціації  $K_D$  приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М або менше, приблизно  $5 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $1 \times 10^{-10}$  М або менше, приблизно  $5 \times 10^{-11}$  М або менше, або приблизно  $1 \times 10^{-11}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 відповідно до плану експерименту, описаного в розділі «Вимірювання афінності» у прикладі 1.

У деяких варіантах втілення антитіло інгібує опосередковану shCD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  від приблизно  $7,0 \times 10^{-11}$  М до приблизно  $6 \times 10^{-10}$  М.

У деяких варіантах втілення антитіло інгібує опосередковану shCD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

У деяких варіантах втілення антитіло належить до ізотипу IgG1 і порівняно з IgG1 дикого типу необов'язково містить у важкому ланцюзі заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S.

У деяких варіантах втілення антитіло містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66 і належить до ізотипу IgG1 і порівняно з IgG1 дикого типу необов'язково містить у важкому ланцюзі заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S.

У деяких варіантах втілення антитіло містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66 і належить до ізотипу IgG1/к і порівняно з IgG1 дикого типу містить у важкому ланцюзі заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S.

У деяких варіантах втілення антитіло належить до ізотипу IgG2 і порівняно з IgG2 дикого типу необов'язково містить у важкому ланцюзі заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S.

У деяких варіантах втілення антитіло містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66 і належить до ізотипу IgG2/к і порівняно з IgG2 дикого типу містить у важкому ланцюзі заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S.

У деяких варіантах втілення антитіло містить важкий ланцюг (HC) із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг (LC) із SEQ ID NO: 81.

У деяких варіантах втілення антитіло містить важкий ланцюг (HC) із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг (LC) із SEQ ID NO: 81.

У деяких варіантах втілення антитіло являє собою біспецифічне антитіло.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування аутоімунного захворювання.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування імуноопосередкованого запального захворювання.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування артриту.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування системного червоного вовчака.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування запального захворювання кишечника.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування під час трансплантації.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування під час трансплантації нирок.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування під час трансплантації шкіри.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування під час трансплантації кісткового мозку.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування реакції «трансплантат проти хазяїна».

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування імунної тромбоцитопенічної пурпури.

5 Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування розсіяного склерозу.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування тиреоїдиту.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування цукрового діабету I типу.

10 Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування атеросклерозу.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування ревматоїдного артриту.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування хвороби Крона.

15 Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування виразкового коліту.

Антитіло є придатним для застосування в терапії, наприклад для лікування запального захворювання кишечника, у комбінації з другим терапевтичним агентом.

Цей винахід далі буде описаний з посиланням на наступні специфічні необмежуючі приклади.

20 Приклад 1. Матеріали й способи

Створення використовуваних білків

Як сигнали ендogenous CD154 у вигляді тримера багатьма способами експресували рекомбінантний CD154 з отриманням функціонального рекомбінантного тримера. Розчинний CD154 людини (shCD154; SEQ ID NO: 4), розчинний CD154 *Callithrix jacchus* (ігрунки звичайної; у цьому документі називається мавпою-ігрункою) (smCD154; SEQ ID NO: 5) або розчинний CD154 *Macaca fascicularis* (яванського макака, у цьому документі називається суро) (scCD154; SEQ ID NO: 6) клонували й експресували як злиття з His6 (SEQ ID NO: 10) (shCD154-his, SEQ ID NO: 7; smCD154-his, SEQ ID NO: 8; scCD154-his, SEQ ID NO: 9) або як злиття з «лейциновою застіркою» (ILZ) (SEQ ID NO: 11) (shCD154-ILZ, SEQ ID NO: 12; smCD154-ILZ, SEQ ID NO: 13; scCD154-ILZ, SEQ ID NO: 14). Клонування, експресію й очищення білків здійснювали стандартними способами. І злиття His, і злиття ILZ були переважно тримерами. smCD154 і smCD154-ILZ піддавали біотинілуванню за допомогою набору EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin and Labeling Kit (Thermo, номер за каталогом 21327), успішність біотинілування аналізували за допомогою аналізів HABA-авідин (Thermo, номер за каталогом 46610) і Octet. У деяких аналізах використовували клітини, що експресують CD40 людини (SEQ ID NO: 15). У деяких аналізах використовували клітини D1.1 Jurkat (ATCC® CRL-10915™), які ендogenous експресують CD154 людини.

CD154 людини; SEQ ID NO: 1

40 MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKT  
IQR CNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTTSV  
LQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL  
LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

CD154 мавпи-ігрунки; SEQ ID NO: 2

45 MIETYNQVPVPSAATGPPVSMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMK  
TIQR CNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTTS  
VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERI  
LLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

CD154 яванського макака; SEQ ID NO: 3

50 MIETYNQPSPRPSAATGLPVRMKIFMYLLTIFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKT  
IQR CNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEEKKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTTSV  
LQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL  
LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

shCD154; SEQ ID NO: 4

55 MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  
CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP S  
QVSHGTGFTSFGLLKL

smCD154; SEQ ID NO: 5

60 MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  
CSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDP S  
QVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154; SEQ ID NO: 6  
MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF  
CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP  
QVSHGTGFTSFGLLKL

5 shCD154-his; SEQ ID NO: 7  
GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTV  
KRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL  
QPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

10 smCD154-his; SEQ ID NO: 8  
GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTV  
KRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPPNRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGIFELQ  
PGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

15 scCD154-his; SEQ ID NO: 9  
GSHHHHHHGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTV  
KRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFEL  
QPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

His6; SEQ ID NO: 10

HHHHHH

ILZ; SEQ ID NO: 11

20 RMKQIEDKIEILSKIYHIENEIARIKKLIGER

shCD154 -ILZ; SEQ ID NO: 12

GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEA  
SSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSP  
GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

25 smCD154 -ILZ; SEQ ID NO: 13

GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEA  
SSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKPP  
NRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

scCD154-ILZ; SEQ ID NO: 14

30 GSHHHHHHGGGSRMKQIEDKIEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEA  
SSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSP  
GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL

людський CD40; SEQ ID NO: 15

35 mvrplqcvlwgclltavhpeptacrekqylinsqccslcpggqklvsdcteftetecpcgeselfdtwnrethchqhkycdpnlgrrvqq  
kgtsetdtictceegwhctseacescvlhrscspgfgvkqiatgvsdticepcpvgffsnvssafekchpwtscetkdlvvqqagtnktdvvcgp  
qdriralvviifgilfailvlfikkvakkptnkaphpkqepqeqinfddlpgsntaapvqetlhgcqpvtqedgkesrisvqerq

Вимірювання афінності

Вимірювання афінності за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR)  
виконували з використанням системи ProteOn XPR36 (BioRad). Поверхню біосенсора готували  
40 шляхом з'єднання антитіла до людського IgG (Fc) (Jackson номер за каталогом 109-005-098) із  
модифікованою поверхнею альгінатного полімерного шару сенсорного чипа GPX (BioRad номер  
за каталогом 176-5011) із використанням інструкцій виробника щодо хімічного амінозв'язування.  
Імобілізували приблизно 4700 ОВ (одиниць відповіді) досліджуваного антитіла. Експерименти  
з дослідження кінетики виконували за температури 25 °C у рухомому буфері (ДФБР + 0,03 %  
45 полісорбату Р20 + 100 мкг/мл БСА). Для проведення експериментів з дослідження кінетики  
захоплювали 100 ОВ антитіл з наступними введеннями аналітів (shCD154-his і smCD154-his) у  
концентраціях у діапазоні від 0,391 нМ до 100 нМ (у серійних 4-кратних розведеннях). Фазу  
асоціації відстежували протягом 3 хвилин за швидкості 50 мкл/хв, а потім протягом 15 хвилин  
буферного потоку (фаза дисоціації). Поверхню чипа відновлювали двома 18-секундними  
50 імпульсами зі 100 мМ Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> (Sigma, номер за каталогом 7961) за швидкості 100 мкл/хв.

Зібрані дані обробляли за допомогою програмного забезпечення ProteOn Manager. Спочатку  
дані коригували для фону з використанням відстані між точками. Потім виконували подвійне  
віднімання еталонних даних з використанням ін'єкції буфера замість ін'єкції аналіту. Кінетичний  
аналіз даних проводили з використанням моделі зв'язування Ленгмюра 1 : 1.

55 CD154-індукована активація клітин лінії Ramos

Здатність антитіл до CD154 інгібувати активацію клітин лінії Ramos оцінювали з  
використанням CD54 як маркера клітинної активації. Клітини Ramos (клітини лімфоми Беркитта,  
ATCC® CRL-1596™), які зберігали відповідно до протоколу постачальника, висівали в 96-ямкові  
планшети з v-подібним дном у концентрації 2,0 × 10<sup>5</sup> клітин/ямка у повне середовище для  
60 культивування в об'ємі 100 мкл/ямка. Досліджувані антитіла в концентраціях 0,2, 2 або 20

мкг/мл попередньо інкубували з 40 нг/мл smCD154-his протягом 1 год за кімнатної температури (КТ), а потім додавали до клітин. Планшет покривали й інкубували протягом ночі (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Наступного дня аналітичний планшет центрифугували й видаляли відпрацьоване середовище для обробки. Отриманий клітинний осад промивали холодним ФБР/2 % фетальної бичачої сироватки (ФБС), а потім клітини забарвлювали антитілом до CD54, міченим фікоеритрином (ФЕ) (ICAM-1), або відповідним ізотипним контролем протягом 1 год за 4 °C. Клітини промивали холодним ФБР/2 % ФБС, ресуспендували в 100 мкл/ямка холодного ФБР/2 % ФБС, і за допомогою проточного цитометра вимірювали флуоресцентний сигнал (жовтий канал). Визначали, що антитіла є антагоністами, якщо вони відповідали таким критеріям: % ефективності порівняно з антитілом 5C8 перевищує 5 % ефективності 5C8, де % ефективності стосується нормалізованого відсоткового інгібування порівняно з 5C8 у найвищій дослідженій концентрації.

#### Аналіз репортерного гена NF-κB-SEAP

Здатність антитіл до CD154 інгібувати індуковані CD154 низхідні шляхи сигналізації CD40 оцінювали з використанням клітин HEK-Blue™ CD40L (Invivogen), сконструйованих для експресії людського CD40 і трансфікованих репортерним геном секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF-κB-індуцибельного промотора (IFN-β мінімального промотора). Клітини стимулювали за допомогою CD154 людини або яванського макака або клітинами Jurkat. Клітини HEK-Blue™ CD40L зберігали відповідно до протоколу постачальника, і всі аналізи активності виконували в середовищі DMEM з додаванням 10 % інактивованої нагріванням фетальної бичачої сироватки й 1X глутамаксу. Клітини висівали в 96-ямкові планшети для культивування тканин зі щільністю клітин 2,5 або 5 × 10<sup>4</sup> клітин на ямку в об'ємі 100 мкл і інкубували протягом ночі (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Наступного дня 4-кратні розчини shCD154-His або shCD154-ILZ або клітини D1.1 Jurkat попередньо інкубували з 4-кратними розчинами антитіл до CD154 (у відповідних концентраціях) у співвідношенні 1 : 1 з отриманням 2-кратних розчинів сумішей попередніх комплексів CD154 : антитіло. Суміші CD154 : антитіло інкубували за КТ протягом 1 год, тоді як суміш D1.1 Jurkat : mAb інкубували за 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> протягом 1 год. Наприкінці періоду інкубації попереднього комплексу до 96-ямкових аналітичних планшетів, що містили клітини HEK-Blue™ CD40L, додавали 100 мкл/ямка 2-кратних розчинів попереднього комплексу; кінцевий аналітичний об'єм становив 200 мкл/ямка з кінцевими концентраціями CD154 80 нг/мл shCD154-His, або 40 нг/мл shCD154-ILZ, або 2,5–6,0 × 10<sup>4</sup> клітин D1.1 Jurkat. Після періоду обробки тривалістю 16–24 год (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) супернатанти аналізували на активність фосфатази (SEAP) шляхом вимірювання поглинання (650 нм) 40 мкл/ямка супернатантів, які інкубували з 160 мкл/ямка QUANTI-Blue™ (Invivogen) за 37 °C протягом 30–60.

#### Аналіз активації дендритних клітин, опосередкованої клітинами Jurkat

Здатність антитіл до CD154 інгібувати активацію ДК, опосередковану клітинами Jurkat, оцінювали шляхом вимірювання зниженої продукції різних цитокінів дендритними клітинами. Моноцити людини (Biologic Specialties) культивували з 50 нг/мл IL-4 і GM-CSF протягом шести днів. На 3-й день до клітин додавали свіже середовище (з IL-4 і GM-CSF). На 6-й день у клітинних аналізах використовували незрілі ДК (нДК) (CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>низький</sup> CD83<sup>+</sup>). 2,5 × 10<sup>5</sup> клітин D1.1 Jurkat (опромінених за 1000 рад) інкубували з 0,000064–25 мкг/мл мкг/мл антитіла до CD154 протягом 15–20 хвилин, а потім культивували спільно з 2,5 × 10<sup>4</sup> нДК у кінцевому об'ємі 200 мкл/ямка у 96-ямковому круглодонному планшеті. Після 48-годинної інкубації супернатанти збирали для аналізу цитокінів.

#### Аналіз активації В-клітин, опосередкованої клітинами Jurkat

Здатність антитіл до CD154 інгібувати активацію В-клітин, опосередковану клітинами Jurkat, оцінювали шляхом визначення впливу антитіл на проліферацію В-клітин. 1 × 10<sup>5</sup> клітин D1.1 Jurkat (опромінених за 5000 рад) культивували спільно з 1 × 10<sup>5</sup> В-клітин мигдалеподібних залоз людини за присутності IL-21 (100 нг/мл) і 0,0077 нг/мл–15 мкг/мл антитіл до CD154 у кінцевому об'ємі 200 мкл/ямка у 96-ямковому круглодонному планшеті. Після 2 днів інкубації до культури додавали метил (-3H)-тимідин (0,5 мкКі/ямка), і після інкубування протягом однієї ночі визначали проліферацію В-клітин людини.

#### Аналіз активації В-клітин, опосередкованої CD154

Здатність антитіл до CD154 інгібувати активацію В-клітин, опосередковану рекомбінантним CD154, оцінювали на В-клітинах людини або яванського макака. 1 × 10<sup>5</sup> В-клітин мигдалеподібних залоз людини або клітин селезінки яванського макака культивували з 100 нг/мл rhIL-21, 0,5 мкг/мл shCD154-ILZ і 0,0077 нг/мл–15 мкг/мл антитіл до CD154 у кінцевому об'ємі 200 мкл/ямка у 96-ямковому круглодонному планшеті. Після 2 днів інкубації до культури



додавали метил (-3H)-тимідин (0,5 мкКі/ямка), і після інкубування протягом однієї ночі визначали проліферацію В-клітин людини.

Приклад 2. Виділення антитіл до CD154 із бібліотек фагового дисплея

Fab, що зв'язують CD154, вибирали з бібліотек фагового дисплея *de novo* pIX, як описано в Shi et al., J Mol Biol 397:385–96, 2010; міжнародній патентній публікації № WO2009/085462; публікації патенту США № US2010/0021477). Коротко, бібліотеки створювали шляхом диверсифікації каркасів людського походження, де гени IGHV1-69\*01, IGHV3-23\*01 і IGHV5-51\*01 зародкової лінії VH рекомбінували з людським мінігеном IGHJ-4 через петлю H3, і гени O12 (IGKV1-39\*01), L6 (IGKV3-11\*01), A27 (IGKV3-20\*01) і B3 (IGKV4-1\*01) людської зародкової лінії VL карпа рекомбінували з мінігеном IGKJ-1 для складання повних доменів VH і VL. Для диверсифікації вибрали положення варіабельних областей важких і легких ланцюгів навколо петель H1, H2, L1, L2 і L3, які відповідають положенням, визначеним як ті, що часто контактують із білковими й пептидними антигенами. Відмінність послідовності в обраних положеннях обмежувалася залишками, які зустрічаються в кожному положенні в сімействах генів IGHV або IGLV зародкової лінії відповідних генів IGHV або IGLV. Відмінність на петлі H3 створювали з використанням короткої та середньої синтетичних петель довжиною 7–14 амінокислот. Розподіл амінокислот на H3 створили з метою імітації варіації амінокислот, яку спостерігали в людських антитілах. Розробку бібліотеки докладно описано в Shi et al., J Mol Biol 397:385–96, 2010. Каркаси, які використовували для створення бібліотек, назвали відповідно до генів VH і VL людської зародкової лінії, з яких вони походять. Для створення 12 унікальних комбінацій VH : VL для експериментів пенінгу проти smCD154 або клітин, що експресують повнорозмірний CD154 яванського макака, три бібліотеки важких ланцюгів об'єднували з чотирма легкими ланцюгами зародкової лінії або бібліотеками легких ланцюгів зародкової лінії.

Проводили пенінг бібліотек або щодо повнорозмірного CD154 яванського макака (SEQ ID NO: 3), що стабільно експресується в клітинах CHO, або щодо біотинільованого й небіотинільованого smCD154 (SEQ ID NO: 5). Після декількох раундів пенінгу проводили аналіз ELISA з поліклональними фагами з використанням як антигенів smCD154 для визначення специфічного збагачення окремих експериментів пенінгу. Фаг, зібраний у тих експериментах пенінгу, які продемонстрували збагачення агентів зв'язування з smCD154, піддавали додатковому скринінгу з моноклональними Fab за допомогою аналізу ELISA, у якому як агенти зв'язування з небіотинільованим smCD154, безпосередньо нанесеним на планшет, використовували Fab-білки, експресовані з окремих Fab-клонів. Fab-клони з сигналом зв'язування, який у чотири рази перевищував негативні контрольні Fab, відбирали для скринінгу в повному форматі IgG. Вибрані Fab клонували в основний ланцюг IgG2sigma/карпа і додатково характеризували з використанням для зв'язування клітин D1.1 Jurkat. IgG2sigma має нефункціональний Fc і порівняно з IgG2 дикого типу містить заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S. IgG2sigma описано в патенті США № 8,961,967.

Приклад 3. Створення антитіл до CD154 у щурів

Антитіла до CD154 створювали з використанням трансгенних щурів, що експресують локуси імуноглобуліну людини, OmniRat®; OMT, Inc. Ендогенні локуси імуноглобуліну людини в OmniRat® замінюють людськими локусами Igk і Igl, і химерний локus IgH людини/щура з сегментами V, D і J людського походження зв'язують із локусом C<sub>H</sub> щура. Локus IgH містить 22 людські V<sub>H</sub>, усі людські сегменти D і J<sub>H</sub> у природній конфігурації, зв'язані з локусом C<sub>H</sub> щура. Створення і характеристику OmniRat® описано в Osborn, et al. J Immunol 190: 1481–1490, 2013; і міжнародній патентній публікації № WO2014/093908.

OmniRat® імунізували з використанням smCD154 відповідно до протоколу повторної імунізації з введенням у множину місць (RIMMS). Після 45-денного режиму імунізації в усіх чотирьох щурів збирали лімфатичні вузли й використовували для отримання гібридом. Супернатанти гібридами в 96-ямкових планшетах піддавали скринінгу шляхом аналізу зв'язування ELISA для ідентифікації mAb, які демонструють зв'язування з smCD154, із яких були вибрані супернатанти гібридами, для яких сигнал у аналізі в 3 рази перевищував середнє значення негативного контрольного зразка.

Вибрані антитіла клонували як повнорозмірні IgG2sigma/λ. Антитіла, які демонстрували антагоністичну активність щодо індукованої CD154 активації клітин Ramos, відбирали для додаткового визначення характеристик.

Приклад 4. Визначення характеристик антитіл

Декілька антитіл до CD154, отриманих із фагового дисплея або трансгенних тварин, які експресують людські імуноглобулінові локуси, що продемонстрували антагоністичну активність, як описано в прикладах 2 і 3, піддавали секвенуванню й додатковій характеристиці щодо їхнього зв'язування з дендритними клітинами людини і яванського макака, щодо їхньої здатності

інгібувати функції дендритних і В-клітин людини і яванського макака й щодо ефекторних функцій антитіла. Області VH і VL антитіл піддавали секвенуванню з використанням стандартних способів.

У таблиці 2 показані амінокислотні послідовності HCDR1 вибраних антитіл.

У таблиці 3 показані амінокислотні послідовності HCDR2 вибраних антитіл.

У таблиці 4 показані амінокислотні послідовності HCDR3 вибраних антитіл.

У таблиці 5 показані амінокислотні послідовності LCDR1 вибраних антитіл.

У таблиці 6 показані амінокислотні послідовності LCDR2 вибраних антитіл.

У таблиці 7 показані амінокислотні послідовності LCDR3 вибраних антитіл.

У таблиці 8 показані амінокислотні послідовності VH вибраних антитіл.

У таблиці 9 показані амінокислотні послідовності VL вибраних антитіл.

Таблиця 2

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

Таблиця 3

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

Таблиця 4

Ідентифікатор mAb	HCDR3	
	Послідовність	SEQ ID NO:
C4LB5	GASVWDGPAEVFDY	29
C4LB89	SRYYGDLDY	30
C4LB94	DTGWVGAFYLDY	31
C4LB150	LQLGTTTDFYFDH	32
C4LB189	DWNYDGSYFGPGYYGLDV	33
C4LB191	EGELAGIFFDY	34
C4LB199	LWLGTTTDFYFDY	35

Таблиця 5

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

Таблиця 6

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

Таблиця 7

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

Таблиця 8

Ідентифікатор mAb	Назва VH	VH	
		Послідовність	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LH12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGASVWDGPAEVFDYW GQGT LTVSS	58
C4LB89	C4LH165	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWV RQAPGQGLEWMGWISPIFGNTNYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRYGDL DYWGQGT LTVSS	59
C4LB94	C4LH99	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGISPYFGNTNYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDTGWVGAFYLDYW GQGT LTVSS	60
C4LB150	C4LH201	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYSFYWG IRQPPGQGLEWIGSLYSGSTYYNPSLKS RATMSVVT KTQFSLNLSVTAADTAVYYCARLQLGTTT DYFDHWGQ GTLTVSS	61
C4LB189	C4LH240	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFAAYYIHWV	62

		RQAPGQGLEWMGRINPDSSGGTDYAQRFQGRVTMTRD TSISTAYMELSRLRSDDTAVFYCARDWNYYDGSFGYFGP GYYGLDVWGQGTTVTVSS	
C4LB191	C4LH242	QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCASGYTFTDYYIHWV RQAPGQGLEWVGRFNPNSGDTNGAQKFQGRVTMTRD TSISTAYMELTRLRSDDTAVYHCAREGELAGIFFDYWG QGTLVTVSS	63
C4LB199	C4LH250	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSFIYYWGW RQPPGKGLDWVGCYSSGGTYYNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLPSTAAADTAVYYCARLWLGTITTDYFDYWGQ GTLVTVSS	64

Таблиця 9

Ідентифікатор mAb	VL	VL	
		Послідовність	SEQ ID NO:
C4LB5	C4LL8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLASSNNENFL AWYQQKPGQPPKLLIYSASTRESGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCQQAYTTPFTFGQGTKVEIK	65
C4LB89	C4LL49	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSSISYLNWYQQ KPGKAPKLLIYANSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL LQPEDFATYYCQQSDSIPWTFGQGTKVEIK	66
C4LB94	PH9L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	67
C4LB150	C4LL82	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDKFACWYQQK PGQSPVLVIWQENKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSDTAVFGGGTKLTVL	68
C4LB189	C4LL116	SYELTQPPSVSVSPGQTASVTCSGDKLGDKYVCWYQR KPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAIDEADYYCQAWDSGTVVFGGRGKTLTVL	69
C4LB191	IAPL39	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWNHQK PGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL	70
C4LB199	C4LL125	SYELTQPPSVSVSPGQTVSITCSGDKLGDKFACWYQQK PGQSPVVVIYQDDKRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISGT QAMDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTKLTVL	71

Антитіла інгібували функцію як ендogenous CD154, забезпеченого на клітинах Jurkat (клітини D1.1 Jurkat у таблиці 10), так і рекомбінантно експресованого тримера CD154 людини (експресований як shCD154-ILZ або shCD154-his) за результатами вимірювання в аналізі репортерного гена NF- $\kappa$ B SEAP. Антитіла інгібували передавання сигналів зі значеннями IC<sub>50</sub> у діапазоні 0,08–21,15 нМ. Значення IC<sub>50</sub> для вибраних антитіл в аналізі наведено в таблиці 10. Діапазон значень IC<sub>50</sub> для кожного антитіла в таблиці представляє найнижчі й найвищі значення IC<sub>50</sub>, отримані в різних експериментах, тоді як єдине значення вказує на те, що антитіло досліджували в одному експерименті або що доступне було тільки одне дійсне значення IC<sub>50</sub>.

Таблиця 10

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

\* Для індукування сигналіну використовували формат CD154

Здатність антитіл інгібувати активацію дендритних клітин оцінювали як описано вище, з використанням секреції IL-12p40 як маркера активації ДК. Антитіла інгібували активацію ДК, індуковану ендогенним CD154, забезпеченим на клітинах Jurkat, зі значеннями IC<sub>50</sub> у діапазоні 0,02–0,49 нМ. У таблиці 11 показано значення IC<sub>50</sub> в аналізі для вибраних антитіл. Діапазон значень IC<sub>50</sub> у таблиці представляє найнижче й найвище значення IC<sub>50</sub>, отримані в окремих експериментах у 1–6 повторях серед 2–4 донорів.

Таблиця 11

Ідентифікатор mAb	Аналіз активації дендритних клітин, опосередкованої клітинами Jurkat; IC <sub>50</sub> (нМ)
C4LB5	0,32–0,49
C4LB89	0,02–0,09
C4LB94	0,07–0,09
C4LB150	0,25–0,30
C4LB189	0,15–0,16
C4LB191	0,38–0,39
C4LB199	0,19–0,20

Здатність антитіл інгібувати активацію В-клітин людини або яванського макака вимірювали з використанням показників В-клітинної проліферації. Антитіла інгібували проліферацію, індуковану як ендогенним CD154 (клітини D1.1 Jurkat), так і рекомбінантним тримером CD154 людини (shCD154-ILZ), зі значеннями IC<sub>50</sub> у діапазоні 0,01–5,35 нМ. У таблиці 12 продемонстровані значення IC<sub>50</sub> для різних антитіл, отримані в аналізі активації В-клітин людини або яванського макака. Діапазон значень IC<sub>50</sub> у таблиці представляє найнижче й найвище значення IC<sub>50</sub>, отримані в окремих експериментах у 1–6 повторях серед 2–4 донорів. Єдине значення IC<sub>50</sub> у таблиці вказує на те, що доступне тільки одне дійсне значення IC<sub>50</sub>.

Таблиця 12

Ідентифікатор mAb	Аналіз активації В-клітин; IC <sub>50</sub> (нМ)		
	Клітини D1.1 Jurkat/В-клітини людини *	shCD154-ILZ/В-клітини людини *	shCD154-ILZ/В-клітини яванського макака *
C4LB5	0,19–0,28	2,74	5,35
C4LB89	0,01–0,02	0,20–0,48	0,13–0,44
C4LB94	0,01–0,03	0,07–0,14	0,30–0,31
C4LB150	0,27–0,31	нв	1,14–2,00
C4LB189	0,47–0,65	нв	4,35–5,16
C4LB191	0,64–1,00	нв	0,25–0,36
C4LB199	0,04–0,27	нв	1,89–2,31

нв: не виконували

\* Для індукування сигналіну використовували формат CD154/джерело В-клітин

Приклад 5. Конструювання антитіл для мінімізації ризику післятрансляційної модифікації

Область VL антитіла C4LB89 містила ймовірний сайт дезамінації у LCDR2 (N52–S53 у легкому ланцюзі C4LL49, SEQ ID NO: 66). Заміщення виконували окремо в кожній позиції (N52S і S53T) у VL. Мутовані легкі ланцюги були експресовані спільно з батьківським важким ланцюгом C4LH165 (SEQ ID NO: 59) з отриманням антитіл C4LB235 і C4LB236 у вигляді IgG2sigma/к. Амінокислотні послідовності LCDR2 і VL у C4LB235 і C4LB236 показані в таблиці 13 і таблиці 14 відповідно. C4LB235 містить HCDR із SEQ ID NO: 17, 23 і 30, LCDR із SEQ ID NO: 37, 49 і 52, VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72. C4LB236 містить HCDR із SEQ ID NO: 17, 23 і 30, LCDR із SEQ ID NO: 37, 50 і 52, VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.

Таблиця 13

Ідентифікатор mAb	LCDR2	
	Послідовність	SEQ ID NO:
C4LB235	YASSLQS	49
C4LB236	YANTLQS	50

Таблиця 14

Ідентифікатор mAb	VL	VL	
		Послідовність	SEQ ID NO:
C4LB235	C4LL160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTF GQGTKVEIK	72
C4LB236	C4LL161	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYYANTLQSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSIPWTF GQGTKVEIK	73

Обидва антитіла досліджували на їхню здатність інгібувати проліферацію В-клітин яванського макака. Антитіло C4LB235 продемонструвало аналогічну ефективність із C4LB89, тоді як антитіло C4LB236 продемонструвало знижену ефективність порівняно з C4LB89.

Приклад 6. Антитіла до CD154 з відключеною ефекторною функцією не індують активацію тромбоцитів

Були розроблені антитіла до CD154 з позитивними клінічними результатами у пацієнтів з аутоімунними захворюваннями, однак через випадки тромбоемболії (ТЕ) подальша клінічна розробка антитіл була зупинена. Гуманізоване антитіло 5с8 (IgG1/к) являє собою антитіло до CD154, яке в клінічних умовах індукувало ТЕ (Yazdany et al., *Lupus* 13:377–380, 2004). Передбачається, що тромбоемболія (ТЕ), опосередкована гуманізованим антитілом 5с8, є результатом активації й агрегації тромбоцитів через утворення високовпорядкованих імунних комплексів (IC) «антитіло до CD154/CD154», які поперечно зшивають тромбоцити шляхом зв'язування Fc з рецептором FcγRIIa тромбоцитів. В умовах *in vitro* сконструйоване антитіло 5с8 з пригніченим Fc (заміщення D265A в IgG1) із відсутністю зв'язування з рецептором FcγRIIa не активувало тромбоцити (Xie et al., *J Immunol* 192:4083–4092, 2014).

Таким чином, антитіла до CD154 з вимкненим зв'язуванням з принаймні FcγRIIa і зниженими ефекторними функціями, можуть бути більш придатними як терапевтичний засіб зі зменшеним ризиком розвитку ТЕ.

З цією метою були створені антитіла до CD154 без ефекторної функції з різними заміщеннями Fc, і вони були досліджені щодо їхнього впливу на активацію тромбоцитів.

VH і VL гуманізованого антитіла 5с8 (Karpusas et al., *Structure* 9: 321–329, 2001) клонували як IgG1sigma/к, IgG1sigmaYTE/к, IgG2sigma/к або IgG2sigmaYTE/к, щоб оцінити вплив Fc на активацію тромбоцитів; отримані антитіла назвали 5с8IgG1sigma, 5с8IgG1sigmaYTE, 5с8IgG2sigma і 5с8IgG2sigmaYTE. IgG1sigma порівняно з IgG1 дикого типу містить заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S. IgG1sigmaYTE містить заміщення L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E H268A, A330S і P331S. IgG2sigma містить заміщення V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S. IgG2sigmaYTE містить заміщення V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S і P331S. Нумерація залишків відповідає індексу EU. В антитілах з основним ланцюгом IgG2sigma відсутні

ефекторні функції й зв'язування з FcγR, як описано в патенті США № 8,961,967. Заміщення YTE (M252Y, S254T, T256E) описані в Dall'Acqua et al., J Biol Chem 281:23 514–24, 2006.

Домени VH і VL гуманізованого 5c8 показані в SEQ ID NO: 74 і 75 відповідно.

SEQ ID NO: 74

5 qvqlvqsgaevvkpgasvklscasgyiftsyymyvwkqapggglewigeinpsngdtnfnfkfskatltvdksastaymelsslrse  
dtavyyctrsdgrndmswgqgtltvss

SEQ ID NO: 75

divltqspatlsvspgeratiscrasqrvssstysymhwyqqkpgqppkllikyasnlesgvparfsgsgsgtdftltissvepedfatyycq  
hsweippftfgggtkleik

10 5c8IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma і 5c8IgG2sigmaYTE досліджували щодо  
їхнього впливу на активацію тромбоцитів.

Використовували кров від здорових донорів, попередньо відібрану через низьку відповідь на  
shCD154. Активацію тромбоцитів оцінювали за допомогою проточної цитометрії з  
використанням перевірених маркерів активації тромбоцитів PAC-1 (активованій GPIIb/IIIa) і  
15 CD62p (P-селектин). Якщо коротко, цільну кров (WB) додавали до модифікованого буфера  
Tyrodes-HEPES, який містив 1 mM CaCl<sub>2</sub>, і до суміші додавали антитіла до PAC1 і до CD62p з  
FcγRIIa-блокувальним антитілом (клон IV.3, StemCell Technologies, номер за каталогом 60012)  
або без нього та інкубували протягом 25 хвилин. До суміші додавали попередньо утворені  
імунні комплекси розчинного CD154 (PeproTech, номер за каталогом 310-02; SEQ ID NO: 4 або  
20 Tonbo Biosciences, номер за каталогом 21-7088)/антитіла у молярному співвідношенні 3 : 1  
CD154 : антитіло до CD154 і інкубували ще протягом 20 хвилин; тромбоцити фіксували в 1 %  
формаліні, після чого виконували аналіз FACS. Активацію тромбоцитів для кожного стану  
оцінювали як % стробованих тромбоцитів (CD61-позитивних подій), що експресують PAC-1 і  
CD62p; Для кожного стану лікування реєстрували й аналізували 5000 подій експресії CD61  
25 (тромбоцити). Результати експерименту показані на Фіг. 1. IC CD154/5c8IgG1 (IgG1 дикого типу)  
активував тромбоцити, тоді як IC CD154 із 5c8-IgG1sigma, 5c8IgG1sigmaYTE, 5c8IgG2sigma і  
5c8IgG2sigma-YTE не активували тромбоцити. Імунні комплекси не інгібували активацію  
тромбоцитів АДФ (дані не показані). Жодне з антитіл саме по собі не активувало тромбоцити  
(дані не показані).

30 Антитіла до CD154 C4LB5, C4LB89, C4LB94, C4LB150, C4LB189, C4LB191, C4LB199 (усі  
mAb з вимкненою ефекторною функцією IgG2sigma) також досліджували в аналізі активації  
тромбоцитів для підтвердження того, що в цих антитілах було вимкнене зв'язування з FcγRIIa і  
що вони не активують тромбоцити. На Фіг. 2 показані результати експерименту, який  
демонструє, що імунним комплексам CD154 у сукупності з C4LB5, C4LB89, C4LB150, C4LB189,  
35 C4LB191 або C4LB199 не вдалося активувати тромбоцити. Комплекс CD154/C4LB94 IC  
індукував PAC-1 на тромбоцитах. Результати демонструють, що антитіла до CD154 з ізотипами  
IgG1sigma, IgG1sigmaYTE, IgG2sigma або IgG2sigmaYTE по суті можуть не активувати  
тромбоцити й тому можуть мати покращений профіль безпечності порівняно з антитілами IgG1  
дикого типу.

40 Приклад 7. Вплив перемикання ізотипів на властивості антитіл

Варіабельні області антитіла C4LB89 клонували як ізотипи IgG1sigma/k і IgG1sigmaYTE для  
оцінки можливих відмінностей у функціональності й можливості проведення розробки. Нові  
антитіла назвали C4LB231 (IgG1sigma) і C4LB232 (IgG1sigmaYTE).

Отримані антитіла IgG1sigma і IgG1sigmaYTE порівнювали за функціональністю з  
45 батьківським антитілом. Функціонально C4LB231 і C4LB232 були порівнянними з батьківським  
C4LB89. У таблиці 15 показані значення IC<sub>50</sub> або діапазон значень IC<sub>50</sub> для кожного антитіла у  
функціональних аналізах, зазначених у таблиці. Діапазон значень IC<sub>50</sub> у таблиці представляє  
найнижче й найвище значення IC<sub>50</sub>, отримані в експериментах у 1–6 повторах серед 2–4  
50 донорів. Єдине значення IC<sub>50</sub> у таблиці вказує на те, що доступне тільки одне дійсне значення  
IC<sub>50</sub>.

Таблиця 15

Аналіз	Для індукування сигналіну використовували формат CD154	mAb	
		C4LB231	C4LB232
Аналіз репортерного гена NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	D1.1 Jurkat		0,27
Аналіз репортерного гена NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-ILZ	1,21	1,25–1,45
Аналіз репортерного гена NF-κB SEAP; IC <sub>50</sub> (нМ)	shCD154-his	2,15	1,77–1,99
Аналіз активації дендритних клітин, опосередкованої клітинами Jurkat; IL-12p40 IC <sub>50</sub> (нМ)	D1.1 Jurkat	0,02–0,04	0,03–0,03
IC <sub>50</sub> (нМ) проліферації В-клітин людини	D1.1 Jurkat	0,01–0,01	0,01–0,01
IC <sub>50</sub> (нМ) проліферації В-клітин людини	shCD154-ILZ	0,38–0,67	0,42–0,74
IC <sub>50</sub> (нМ) проліферації В-клітин яванського макака	shCD154-ILZ	0,25–0,55	0,20–0,55

Також досліджували вплив C4LB231 і C4LB232 на тромбоцити. Ані імунний комплекс shCD154 : C4LB231, ані IC shCD154 : C4LB232 не активували тромбоцити вище вихідного рівня. IC CD154/5c8IgG1 активував тромбоцити, і активація була заблокована за присутності IV.3, що демонструє, що активація тромбоцитів була опосередкована зв'язуванням IC з FcγRIIa. На Фіг. 3 показані результати експерименту.

Приклад 8. Антитіла до CD154 зв'язують CD154 людини з високою афінністю

Вимірювання афінності виконували з використанням системи ProteOn, як описано в прикладі 1. Значення швидкості асоціації, швидкості дисоціації й афінності показані в таблиці 16. Параметри, зазначені в цій таблиці, були отримані з використанням моделі зв'язування Ленгмюра 1 : 1 для всіх зразків, крім C4LB94 і C4LB150, які підганяли з використанням моделі зв'язування двох станів.

Таблиця 16

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

Приклад 9. Кристалічна структура CD154 мавпи-ігрунки в комплексі з C4LB89

Епітоп антитіла C4LB89 ідентифікували за допомогою рентгенівської кристалографії. Мічений гістидином Fab-фрагмент C4LB89 і мічену гістидином розчинну форму CD40L мавпи-ігрунки (smCD154-his) експресували в клітинах HEK293 GnTI і очищали з використанням афінної хроматографії й гель-проникаючої хроматографії. Комплекс smCD154 : C4LB89 інкубували протягом ночі за 4 °С, концентрували й відокремлювали від молекул, що не ввійшли до комплексу з використанням гель-проникаючої хроматографії. Комплекс кристалізували пародифузійним способом із розчину, який містив 16 % ПЕГ 3350, 0,2 М цитрату амонію, 0,1 М MES, рН 6,5. Кристали належать до кубічної просторової групи P2<sub>1</sub>3 з розмірами елементарної комірки 162,1 Å. Структуру комплексу визначали згідно зі способом молекулярного заміщення з використанням як пошукових моделей кристалічних структур C4LB89 Fab і CD40L (у базі даних білків PDB зареєстровано як 1ALY).

Комплекс smCD154 : C4LB89 є симетричним тримером, розташованим на кристалографічній 3-кратній осі. C4LB89 зв'язує mCD154 на межі поділу між двома субодинацями на епітопі,



віддаленому від клітинної поверхні. Епітоп включає 16 залишків, по 8 із кожної з двох субодиниць CD154. Епітопні залишки являють собою E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 і R207 у першій субодиниці CD154 і T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F253 у другій субодиниці CD154. Нумерація залишків епітопа відповідає повнорозмірному CD154 людини із SEQ ID NO: 1. Паратоп визначається як залишки антитіла в межах 4 Å від залишків CD154. Паратоп C4LB89 включає 9 залишків із важкого ланцюга C4LB89: S31 і Y32 із HCDR1, S52, I54, F55 і N57 із HCDR2 і R100, Y101 і Y102 із HCDR3. Нумерація паратопних залишків відповідає VH C4LB89 із SEQ ID NO: 59. Легкий ланцюг не залучений до контактування з mCD154. Ґрунтуючись на кількості контактів, F55 у HCDR2 є ключовим елементом розпізнавання антигена. F55 здійснює контакт із CD154-залишками T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F253. HCDR3-залишки Y101 і Y102 також сприяють зв'язуванню. На Фіг. 4 показані контактні залишки HCDR2 і HCDR3 і відсутність зв'язування LC із CD154. На Фіг. 5 показаний графічний рисунок епітопних і паратопних залишків.

Розчинні білки CD154 людини й мавпи-ігрунки відрізняються лише 8 амінокислотними залишками. Усі епітопні залишки mCD154 C4LB89 у людини є консервативними. Тому очікується, що епітоп є консервативним між CD154 мавпи-ігрунки і людини. Вирівнювання повнорозмірних білків CD154 людини й мавпи-ігрунки продемонстроване на Фіг. 6.

Приклад 10. Активація тромбоцитів антитілами до CD154 залежить від епітопа

Варіабельні області C4LB89 (VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66) клонували як IgG1/κ, отримуючи антитіло C4LB237. За результатами вимірювання з використанням системи ProteOn, як описано в прикладі 1, було підтверджено, що C4LB237 підтримує зв'язування CD154 людини (таблиця 17). Афінність C4LB237 до CD154 людини становила  $23,6 \pm 5,4$  nM. Здається, що перемикання отриманих із C4LB89 ізотипів VH/VL з IgG2sigma на IgG1 змінює афінність зв'язування отриманого антитіла.

Як очікувалось, C4LB237 зв'язував людські FcγRIIa і FcγRIIIa зі значенням  $K_D$  0,994 мкМ і 0,146 мкМ відповідно. C4LB237 продемонстрував ефективність, порівнянну з C4LB231 і більшу, ніж у C4LB89, у аналізі репортерного гена NF-κB SEAP за використання shCD154-his для індукування сигналіну (таблиця 18).

C4LB237 досліджували щодо його впливу на активацію тромбоцитів. IC shCD154:C4LB237 не активували тромбоцити вище вихідного рівня, як показано на Фіг. 7. Цей результат свідчить про те, що на додаток до Fc епітоп антитіла сприяє здатності або нездатності антитіла активувати тромбоцити.

Таблиця 17

Зразок	$k_a$ (1/Mc) $10^6$	$k_d$ (1/c) $10^{-05}$	$K_D$ (nM)
C4LB231 (n = 8)	$2,53 \pm 0,15$	$7,81 \pm 0,69$	$31,0 \pm 3,3$
C4LB232 (n = 8)	$2,54 \pm 0,15$	$8,89 \pm 0,91$	$35,2 \pm 5,2$
C4LB237 (n = 4)	$2,59 \pm 0,20$	$6,05 \pm 0,98$	$23,6 \pm 5,4$

Таблиця 18

mAb	IC <sub>50</sub> (nM)	95 % ДІ IC <sub>50</sub> (nM)
C4LB231	2,32	2,11–2,55
C4LB237	2,56	2,43–2,70
C4LB89	6,22	5,27–7,34

Приклад 11. Конструювання нейтральних мутацій на C4LB89

Аналізи кристалічної структури C4LB89 у комплексі з CD154 виявили положення в CDR C4LB89, які можуть піддаватися мутації без впливу на загальну структуру комплексу й тому, як очікується, не впливають на властивості антитіла C4LB89. Ці нейтральні мутації в CDR легкого ланцюга наведені в таблиці 19, мутації в CDR важкого ланцюга наведені в таблиці 20. Нумерацію залишків, які можуть піддаватися мутації, показано як на окремих CDR, так і на VL або VH. Наприклад, залишок Q4 на LCDR1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN) може піддаватися мутації на A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, R, S, T, V, W або Y із очікуванням того, що характеристики антитіла по суті не змінюються. Відповідним залишком у VL із SEQ ID NO: 66 є Q27.

Мутації, наведені в таблиці 19 або таблиці 20, виконані окремо або в комбінації на C4LB89 із використанням стандартних способів. Отримані пари VH/VL являють собою експресовані й

піддані мутації антитіла, виділені й охарактеризовані з використанням способів, описаних у цьому документі.

Таблица 19

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

Таблица 20

HCDR C4LB89	Залишок HCDR C4LB89	Положення залишків VH (SEQ ID NO: 59) C4LB89	Можливі заміщення
HCDR1 SEQ ID NO: 17 (SYGIS)	S1	S31	A, C, D, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, T, V
	I4	I34	M, L, V
	S5	S35	A
HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG)	S3	S52	A, T, V
	I5	I54	V, T, L, Q, E
	N8	N57	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
	T9	T58	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, Y
	N10	N59	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y
HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY),	S1	S99	A, M
	R2	R100	A, S, Q, K
	R7	L105	M

5

Приклад 12. Оцінювання активації тромбоцитів і утворення імунних комплексів вищого порядку

10

Після оцінки даних кристалічної структури для області Fab і комплексу shCD154 для ранніх експериментів C4LB231 і 5C8IgG1 із використанням методів SC-HPLC і DLS, а також аналізу даних активації тромбоцитів, було висловлено припущення, що невеликі відмінності у зв'язуванні антитіл до CD154 з тримером shCD154 можуть сприяти формуванню імунних

комплексів вищого порядку: 1) Fab C4LB231 зв'язується між 2 субодиницями тримера sCD154, тоді як Fab 5C8 зв'язує 1 субодиницю sCD154, 2) Fab C4LB231 виглядає більш стійким у цій конформації, ніж Fab 5c8, 3) і кут зв'язування антитіла до CD154 із sCD154.

Для додаткової оцінки ролі епітопа антитіла в опосередкуванні активації тромбоцитів і формування імунних комплексів вищого порядку з shCD154 клонували VH і VL різних антитіл до CD154 і експресували як ізотипи IgG2sigma і IgG1sigma з нефункціональним Fc або як IgG1. Створені антитіла показані в таблиці 21. Аналізи активації тромбоцитів проводили, як описано в прикладі 6. Для оцінки утворення імунних комплексів вищого порядку шляхом гелі-проникаючої вискоєфективної рідинної хроматографії (ГП-ВЕРХ) і динамічного розсіювання світла (DLS) антитіла вводили в комплекс зі shCD154 у молярних співвідношеннях 1 : 1 (також відповідає 10 : 10) і 10 : 1, щоб оцінити, чи існують залежні від концентрацій відмінності в утворенні імунних комплексів.

Таблиця 21

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

SEQ ID NO: 84 VH із C4LB119  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYYISWVRQAPGQGLEWMGAIDPYFGYANYAQK  
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTGLNYGGFDYWGGQGLTVTVSS  
 SEQ ID NO: 85 VL із C4LB119  
 eivltqspatlsipgeratlsccrasqsvssylawyqqkpgqaprlliydasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyyccqqrnwp  
 tfgggtkveik  
 SEQ ID NO: 86 VH із C4LB83  
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGWIIPIFGNTNYAQKF  
 QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKDFRGYTKLDYWGGQGLTVTVSS  
 SEQ ID NO: 87 VL із C4LB83  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNWLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS  
 GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSFSPYTFGQGTKVEIK

Характеристики зв'язування й функціональні характеристики C4LB83 і C4LB119 оцінювали з використанням протоколів, описаних у прикладі 1; вони наведені в таблиці 22.

Таблиця 22

Антитіло	ka (1/Mc)	kd (1/c)	K <sub>D</sub> (M)	Аналіз активації В-клітин, IC <sub>50</sub> (нМ) *
C4LB83	2,10E + 06	4,70E - 03	2,23E - 09	0,64–1,09
C4LB119	1,84E + 06	8,80E - 03	4,79E - 09	0,81–2,03

\*shCD154-ILZ-індукована активація В-клітин людини. Діапазон представляє найнижче й найвище значення IC<sub>50</sub>, отримані в окремих експериментах у 2 донорів

Способи  
ГП-ВЕРХ

Імунні комплекси з антитіл, показаних у таблиці 21, і shCD154, міченого Alexafluor-448, отримували в молярному співвідношенні антитіло : shCD154 1 : 1 і 10 : 1 у 110 мкл 1 х ФБР і інкубували за 37 °С протягом 30 хв. У колонку (система Agilent, 1100/1200) для кожного експерименту вводили по 100 мкл кожного зразка, який містив 5 мкг shCD154, міченого AF488, і 15 мкг (співвідношення 1 : 1), або 150 мкг (співвідношення 10 : 1) mAb до CD154. Молекулярну масу розраховували на основі часу утримування стандартних зразків (Bio-Rad). Зв'язок між молекулярною масою й часом утримування білка задовольняє рівнянню:

$$\log(M) = b - cT,$$

де  $M$  — це молекулярна маса,  $T$  — час утримування,  $b$  і  $c$  — константи. Лінійну криву  $\log(M)$  і  $T$  отримували зі стандартних хроматограм ГП-ВЕРХ відповідно до моделі найменших квадратів, де  $R^2 = 0,9928$ .

#### DLS

Вимірювання DLS ґрунтується на принципах розсіювання світла й молекулярному або броунівському русі. Броунівський рух — типова поведінка молекул у розчині — спричиняє розсіювання світла як у фазі, так і поза нею, що призводить до конструктивних і деструктивних інтерференцій. У результаті інтенсивність розсіяного світла з часом коливається. Під час аналізу DLS або QELS (квазіелектричне розсіювання світла) це залежне від часу коливання інтенсивності розсіяного світла реєструється лічильником швидких фотонів. Коливання є прямо пропорційними швидкості дифузії. Аналіз даних кореляції з використанням рівняння Стокса — Ейнштейна дозволяє отримати гідродинамічний радіус. На відміну від гель-проникаючої хроматографії з багатокутним розсіюванням лазерного світла (SEC-MALS) або SEC, де аналіз зразка може розрізнити мономер і димер, DLS дозволяє розрізнити тільки ті молекули, які розділені коефіцієнтом розміру  $\sim 4$ , тому розрізнятися почнуть мономер і тетрамер; проте мономер і димер не розрізнятимуться, але буде повідомлятися середньозважене значення суміші.

Рівняння Стокса — Ейнштейна:  $R_h = kT/6\pi\eta D$ ; де

$D$  = коефіцієнт дифузії,

$k$  = константа Больцмана,

$T$  = температура,

$\eta$  = в'язкість

Антитіла окремо (10 мкМ) або імунні комплекси антитіл, показаних у таблиці 21, і shCD154 отримували в молярних концентраціях антитіло : shCD154 10 : 1 або 10 : 10 (10 мкМ антитіла й або 1 мкМ або 10 мкМ shCD154) у ФБР. Усі зразки готували в скляних флаконах із вкладками у флакони (250 мкл деактивованого скла з полімерними ніжками, Agilent, номер за каталогом 5181-8872), і зразки додавали в наступному порядку: ФБР, mAb, shCD154. Зразки перемішували обережними вихровими рухами, потім інкубували за кімнатної температури зі струшуванням (змішувач Nutating Mixer (VWR),  $\sim 30$  об/хв протягом приблизно 23 год. За потреби антитіла спочатку концентрували з використанням стандартних способів.

Розподіл розмірів частинок і молекул у всіх зразках визначали на приладі DynaPro Plate Reader DLS (Wyatt Technologies Corporation) за температури 23 °С. Узгодженість DLS спочатку підтверджували з використанням БСА (дані не показані). Виміри проводили шляхом введення 30 мкл зразка в кожну з 3 лунок (для трьох повторів). Вимірювання DLS виконували за допомогою спектрофотометра для планшетів DynaPro. Для кожного зразка виконували двадцять 5-секундних реєстрацій даних, причому потужність лазера регулювалася приладом автоматично. Параметри, які використовувалися для аналізу даних, включали в'язкість за 23 °С для ФБР 1,019 сП і значення показника заломлення за 589 нм і 23 °С для ФБР 1,333. У програмі використовувалася глобулярна модель білка. Сигнали об'єднувалися в піки, де пік 1 становив 0,1–10 нм, пік 2 становив 10–100 нм, пік 3 становив 100–1000 нм і пік 4 становив 1000–5000 нм. У зразку спостерігався видимий осад (якщо утворювався). Аналіз даних виконували з використанням програмного забезпечення Dynamics (Wyatt Technology Inc.). Були побудовані графіки відношення маси у відсотках до радіусу молекули ( $R_h$ ). Обчислювали й реєстрували радіус піка, полідисперсність, відсоткову масу й відсоткову інтенсивність.

#### Результати

##### Активация тромбоцитів

Оцінювали здатність імунних комплексів shCD154 і антитіл, які експресуються як IgG2sigma або IgG1sigma з нефункціональним Fc або як IgG1 дикого типу, активувати тромбоцити. Антитіло 5с8, клоноване на різних каркасах IgG, використовували як контроль. На Фіг. 3 показано, що імунні комплекси 5с8IgG1 : shCD154 активували тромбоцити FcγRIIa-залежним способом, оскільки антитіло до FcγRIIa інгібувало 5с8IgG1-опосередковану активацію тромбоцитів. Області VH/VL у 5с8, клоновані в IgG1sigma або IgG2sigma з Fc з відсутніми

ефекторними функціями, втратили свою здатність активувати тромбоцити (Фіг. 1). Ці результати узгоджуються з тим, що було описано раніше. Однак несподівано експерименти, проведені в прикладі 10, показали, що імунні комплекси з антитілом IgG1 дикого типу (C4LB237 : shCD154), не активували тромбоцити (Фіг. 7), що спонукало до подальших досліджень можливої епітопної залежності активації тромбоцитів.

Області VH/VL 4 різних антитіл клонували як IgG2sigma, IgG1sigma або IgG1 дикого типу, щоб оцінити вплив епітопа й/або Fc на активацію тромбоцитів, а також на формування імунних комплексів вищого порядку. Попри те, що було описано в літературі раніше, було виявлено, що активація тромбоцитів у деяких випадках опосередкована епітопом антитіла незалежно від FcγRIIa-опосередкованого поперечного зшивання.

На Фіг. 8A, Фіг. 8B і Фіг. 8C показані сумарні дані аналізів. Імунні комплекси антитіл C4LB119 (Фіг. 8A) і C4LB94 (Фіг. 8B) з нефункціональним Fc активували тромбоцити в FcγRIIa-незалежний спосіб, оскільки попереднє блокування антитілом до FcγRIIa не інгібувало активацію тромбоцитів. IC з антитілом C4LB83, також з нефункціональним Fc, помірно активували тромбоцити (Фіг. 8C). IC з антитілами з ідентичними доменами VH/VL, клонованими на IgG1 дикого типу, у кожному випадку активували тромбоцити FcγRIIa-опосередкованим способом (C4LB278 на Фіг. 8A, C4LB289 на Фіг. 8B і C4LB288 на Фіг. 8C). Таким чином, було ідентифіковано декілька антитіл, які опосередковували активацію тромбоцитів, незважаючи на наявність нефункціонального Fc. Було ідентифіковано одну пару доменів VH/VL, яка не опосередковувала активацію тромбоцитів на IgG1: ані на «мовчазному» (C4LB231) ані на дикого типу (C4LB237). Ці дані показують, що епітоп антитіла відіграє роль у опосередкуванні агрегації тромбоцитів.

Утворення імунних комплексів вищого порядку

ГП-ВЕРХ і DLS використовували для подальшої оцінки наявності утворення імунних комплексів вищого порядку й приблизного розміру цих імунних комплексів між антитілами до CD154, показаними в таблиці 21, і shCD154. Оскільки shCD154 у розчині є тримером, очікувана стехіометрія антитіло : тример shCD154 у розчині становить 3 : 1. Для ГП-ВЕРХ: важчі, а, отже, більші імунні комплекси мали би коротший час утримування, тоді як легші, а, отже, менші імунні комплекси мали би триваліший час утримування, за винятком дуже великих імунних комплексів, які не можуть елюватися з колонки й підтверджуються низьким % відновлення. Для DLS: більше значення радіусу (Rh) означає більший імунний комплекс. Планшетні методики DLS не можуть розрізняти мономери, димери, тримери й тетрамери IgG. Таким чином, отримані значення Rh будуть середньозваженими для мономера – тетрамера, тому значення Rh, більш наближені до 6,5, можуть представляти розчини mAb, що містять молекули вищого порядку, зазвичай димери. Якщо зв'язування mAb із shCD154 є стехіометричним, можуть бути присутніми дві молекули: комплекс 3 : 1 (~ 500 кДа) і незв'язане антитіло (~ 150 кДа), що відповідає значенням Rh ~ 8,8 нм і 5–6,5 нм для комплексу 3 : 1 і вільного mAb відповідно. Жодна з методик не може точно визначити молекулярну масу імунних комплексів, але може визначити порівняльні розміри. У таблиці 23 показана залежність часу утримування й гідродинамічних радіусів для приблизних молекулярних мас.

Таблиця 23

Імунний комплекс	Приблизна молекулярна маса (кДа)	ГП-ВЕРХ, час утримування (хв)	DLS, гідродинамічний радіус (нм)
mAb	150	~ 9 хв	від 5 до 6,5
mAb : shCD154 (тример)	550	~ 7 хв	~ 8,8
Імунні комплекси вищого порядку	~ 1000	< 7 хв	~ 12

#### DLS

Розміри mAb за відсутності CD154 і імунних комплексів антитіло : shCD154 оцінювали в умовах, коли комплекси антитіло : shCD154 утворювалися за надлишку антитіла (молярне співвідношення 10 : 1) і в еквівалентній концентрації (молярне співвідношення 1 : 1). В умовах надлишку антитіла антитіло зазвичай насичує сайти CD154 з утворенням імунного комплексу, і спостерігається присутність надлишку незв'язаного антитіла. В умовах еквівалентної концентрації вільне антитіло або вільний shCD154 відсутні. Значення Rh, отримані для кожного mAb за відсутності shCD154 і за присутності shCD154 у молярних співвідношеннях 10 : 1 і 10 : 10, показані в таблиці 24.

Типове mAb з номінальною молекулярною масою (MM) 150 кДа має значення  $R_h$  5,0–6,5 нм. Димери IgG, які часто спостерігаються під час гель-проникаючої хроматографії, не можуть бути розрізнені за допомогою планшетних методик DLS. Отримані значення  $R_h$  будуть середньозваженими для мономера – тетрамера, тому значення  $R_h$ , більш наближені до 6,5, можуть представляти розчини mAb, що містять молекули вищого порядку, зазвичай димери.

Для mAb за відсутності CD154: очікувані значення  $R_h$  5,5–6,3 нм спостерігалися для всіх mAb, крім C4LB287 і C4LB234, де значення  $R_h$  відповідно 6,9 і 7,1 нм свідчили про те, що ці антитіла мають властиві їм тенденції агрегації.

Значення  $R_h$  для комплексів антитіло : shCD154, утворених у співвідношенні 10 : 1, по суті були меншими ніж приблизно 8,8 нм, що вказує на стехіометричний комплекс 3 : 1 без утворення імунних комплексів вищого порядку, за винятком 5c8IgG2sigma (C4LB71) і C4LB234 (значення  $R_h$  8,9 і 9,3 нм відповідно), що вказує на формування імунних комплексів вищого порядку.

Підвищення концентрації shCD154 до 10 мкМ призводило до утворення імунних комплексів антитіло : shCD154 зі збільшеним  $R_h$  порівняно з комплексами з 1 мкМ CD154 (співвідношення антитіло : CD154 10 : 1). Деякі з комплексів антитіло : shCD154 продемонстрували гетерогенність з присутніми високомолекулярними вторинними молекулами у діапазоні 7–25 % від загальної маси. Значення  $R_h$  для IC C4LB71, 5C8IgG1, C4LB89, C4LB119, C4LB94, C4LB234 і C4LB289 становили відповідно 22,1, 615, 56,3, 45,0, 18,3, 18,7 і 19,6 нм. Крім того, C4LB89, C4LB119, C4LB83, C4LB228 також утворювали молекули 900–4000, а C4LB89 і C4LB119 утворювали осад, що вказує на дуже великі імунні комплекси. Молекули з  $R_h$  близько 12 нм зазвичай відповідають масі ~ 1000 кДа, тому ці mAb за вказаних умов утворюють дуже великі імунні комплекси з CD154.

Таблиця 24

Антитіло	Ізотип	Гідродинамічний радіус ( $R_h$ ), нм		
		10 : 0*	10 : 1*	10 : 10 *
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	5,8	8,9	22,1
5c8IgG1	IgG1	5,7	8,3	19,6
C4LB89	IgG2σ	5,9	5,3, (4082)	615 ppt
C4LB231	IgG1σ	5,9	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	6,1	7,4	9,8
C4LB119	IgG2σ	6,3	8,0	56,3 ppt
C4LB290	IgG1σ	6,1	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	6,9	8,2	12,9
C4LB83	IgG2σ	6	6,1	14,5, (3632)
C4LB288	IgG1	6,1	6,6	10,9
C4LB94	IgG2σ	6,1	6,9	45
C4LB234	IgG1σ	7,1	9,3, (83)	5,3, (18,3)
C4LB289	IgG1	5,6,	7,8, (17, 1350)	3,7, (18,7)

\* Співвідношення антитіло : shCD154

Значення  $R_h$  вторинних молекул були включені в круглі дужки, якщо % мас. становив  $\geq 25$  %

ppt: розчин з осадом

IgG2σ: IgG2sigma

IgG1σ: IgG1sigma

#### ГП-ВЕРХ

У таблиці 25 показано час утримування, швидкість відновлення й розрахункову молекулярну масу (MM) антитіл до CD154 окремо і в імунному комплексі з shCD154, отримані в аналізах ГП-ВЕРХ. Типове антитіло має MM приблизно 150 кДа, а тример shCD154 має MM приблизно 50 кДа. Таким чином, комплекс mAb : тример shCD154 зі стехіометрією 3 : 1 має очікувану молекулярну масу MM приблизно 500 кДа.

Таблиця 25

Ідентифікатор mAb	Тип	Співвідношення*	Час утримування (хв):	Площа піку	% відновлення	ММ (кДа)
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	1 : 1	6,24	6887	85,2	1596,8
		10 : 1	6,28	7348	90,9	1538,2
5c8IgG1	IgG1	1 : 1	7,3	1096	55,7	592,8
		10 : 1	6,92	3280	69,2	845,6
C4LB89	IgG2σ	1 : 1	6,19	356	16,9**	1673,2
		10 : 1	6,35	3662	45,3**	1440,8
C4LB231	IgG1σ	1 : 1	6,97	6766	83,8	807
		10 : 1	6,97	7181	88,9	807
C4LB237	IgG1	1 : 1	6,99	6506	80,5	792,1
		10 : 1	6,99	7977	98,7	792,1
C4LB119	IgG2σ	1 : 1	9,59	307	5,6**	69,7
		10 : 1	8,02	4667	8,3**	302,4
C4LB290	IgG1σ	1 : 1	7,01	4957	61,4	777,4
		10 : 1	7,01	6983	86,4	777,4
C4LB287	IgG1	1 : 1	7	5937	73,5	784,7
		10 : 1	7,02	8011	99,2	770,2
C4LB83	IgG2σ	1 : 1	7,86	5193	64,3	351,2
		10 : 1	7,84	3355	86,9	357,8
C4LB288	IgG1	1 : 1	7,62	4169	70,6	439,5
		10 : 1	7,37	5582	95,5	555,2
C4LB94	IgG2σ	1 : 1	6,01	3233	40,0**	1979,9
		10 : 1	6,02	7748	95,9	1961,5
C4LB234	IgG1σ	1 : 1	6,26	5534	86,6	1567,3
		10 : 1	6,53	7922	98,1	1217,6
C4LB289	IgG1	1 : 1	6,25	5800	83,5	1582
		10 : 1	6,53	7958	98,5	1217,6

\*(mAb : CD154)

\*\* Коефіцієнт відновлення &lt; 50 %

Антитіла з ідентичними VH/VL розбиті на групи, розділені порожніми рядками

IgG2σ: IgG2sigma

IgG1σ: IgG1sigma

Усі антитіла утворювали імунний комплекс із shCD154. C4LB231, C4LB237, C4LB290, C4LB287 (усі IgG1sigma) утворювали імунний комплекс із sCD154 і елюювалися за 7,0 хв, проте C4LB290 і C4LB287 мали нижчий % відновлення в умовах співвідношення 1 : 1 порівняно з умовами 10 : 1, тоді як C4LB231 і C4LB237 мали вищий % відновлення (> 80 %). C4LB289 (IgG1), C4LB234 (IgG1sigma), 5c8IgG1sigma (C4LB71) і C4LB94 (IgG2sigma) елюювалися раніше за 6,2–6,5 хв, що вказує на утворення більш великих комплексів, ніж із вищезгаданими mAb. 5c8IgG1 мало широкий пік у очікуваний час утримування для імунного комплексу 3 : 1 mAb : тример shCD154, однак широкий пік і нижчий рівень відновлення (56 % за умови співвідношення 1 : 1) вказують на те, що можуть утворюватися імунні комплекси вищого порядку, які можуть або взаємодіяти з колонкою або не надходити до неї. C4LB89 і C4LB119 (обидва IgG2sigma) утворювали комплекс із shCD154 і елюювалися з широким піком і дуже низьким відновленням (6–17 % за умови співвідношення 1 : 1), імовірно, через утворення великих комплексів, які не надходили в колонку. Загалом антитіла на основі ізотипів IgG2sigma утворювали більші імунні комплекси порівняно з антитілами на основі IgG1sigma або IgG1.

У таблиці 26 показані зведені дані характеристик антитіл. У цілому, дані активації тромбоцитів, дані ГП-ВЕРХ і DLS разом вказують на те, що активація тромбоцитів не повністю пов'язана з активним Fc. Дані показують, що антитіла з нефункціональним Fc, такі як IgG1sigma й IgG2sigma, здатні утворювати імунні комплекси більшого розміру, тобто більші, ніж очікуваний комплекс 3 : 1 mAb з тримером shCD154, і що деякі антитіла з нефункціональним Fc здатні активувати тромбоцити. Дані підтверджують висновок про те, що як домени VH/VL (наприклад, епітоп, з яким зв'язується антитіло), так і утворення імунних комплексів вищого порядку сприяють активації тромбоцитів.

Таблиця 26

Антитіло	Ізотип	Активация тромбоцитів **	Активация тромбоцитів не залежить від FcγRIIIa	IC ГП-ВЕРХ, час утримання (хв)		IC DLS, Rh (нм)	
				10 : 1*	1 : 1*	10 : 1*	10 : 10 *
5c8IgG2σ (C4LB71)	IgG2σ	Hi		6,3	6,2	8,9	22,1
5c8IgG1σ	IgG1σ	Hi					
5c8IgG1	IgG1	Так	Hi	6,9	7,3	8,3	19,6
C4LB89	IgG2σ	Hi		6,4 <sup>#</sup>	6,2 <sup>#</sup>	5,3, 4082 <sup>^</sup>	615 p
C4LB231	IgG1σ	Hi		7,0	7,0	8,2	10,5
C4LB237	IgG1	Hi		7,0	7,0	7,4	9,8
C4LB119	IgG2σ	Так	Так	8,0 <sup>#</sup>	9,6 <sup>#</sup>	8,0	56,3 p
C4LB290	IgG1σ			7,0	7,0	8,3	13,3
C4LB287	IgG1	Так	Hi	7,0	7,0	8,2	12,9
C4LB83	IgG2σ	Граничний	Так	7,8	7,9	6,1	14,5, 3632 <sup>^</sup>
C4LB288	IgG1	Так	Hi	7,4	7,6	6,6	10,9
C4LB94	IgG2σ	Так	Так	6,0	6,0 <sup>#</sup>	6,9	45
C4LB234	IgG1σ			6,5	6,3	9,3	5,3, 18,3 <sup>^</sup>
C4LB289	IgG1	Так	Hi	6,5	6,3	7,8	3,7, 18,7

\* Співвідношення антитіло : shCD154

\*\* Оцінювання з використанням експресії PAC-1 або CD62p

#% відновлення в ГП-ВЕРХ &lt; 50 %

Значення Rh вторинних молекул були включені, якщо % мас становив ≥ 25 %

p: розчин з осадом

IgG2σ: IgG2sigma

IgG1σ: IgG1sigma

## Перелік послідовностей

5	<110>	Janssen Biotech, Inc. Fransson, Johan Leu, Jocelyn Obmolova, Galina Suri, Anish Teng, Fang
10		Тепляков, Alexey Zhou, Hong
	<120>	Антитіла до CD154 і способи їх застосування
	<130>	JB15068WOPST
	<140>	Перевідступлення прав
15	<141>	04.08.2016
	<150>	62201150
	<151>	05.08.2015
	<150>	62367660
	<151>	28.07.2016
20	<160>	87
	<170>	PatentIn, версія 3.5
	<210>	1
	<211>	261
	<212>	PRT
25	<213>	Homo sapiens
	<400>	1
		Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
		1 5 10 15
30		Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
		20 25 30



	Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg
			35					40					45			
	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val
		50					55					60				
5	Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser
	65					70					75					80
	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys
					85					90					95	
	Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu
10				100					105					110		
	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser
			115					120					125			
	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly
		130					135					140				
15	Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln
	145					150					155					160
	Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr
				165					170						175	
	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser
20				180					185					190		
	Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala
			195					200					205			
	Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His
		210					215					220				
25	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn
	225					230				235						240
	Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe
				245					250						255	
	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu											
30				260												
	<210>	2														
	<211>	261														
	<212>	PRT														
	<213>	Callithrix jacchus														
35	<400>	2														
	Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Asn	Gln	Pro	Val	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly
	1				5					10					15	
	Pro	Pro	Val	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu
				20					25					30		
40	Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg
			35					40					45			
	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val
		50					55					60				
	Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser
45	65					70					75					80
	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys
					85					90					95	
	Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu
				100					105					110		
50	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser
			115					120					125			
	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly
		130					135					140				
	Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln
55	145					150					155					160
	Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr
				165					170						175	
	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser
				180					185					190		
60	Leu	Cys	Leu	Lys	Pro	Pro	Asn	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala
			195					200					205			
	Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His
		210					215					220				
	Leu	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn
65	225					230				235						240
	Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe
				245					250						255	
	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu											

260

<210> 3  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 5 <213> Macaca fascicularis  
 <400> 3

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Pro Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Val Arg Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Ile Phe Leu  
 10 20 25 30  
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg  
 35 40 45  
 Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val  
 50 55 60  
 15 Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Asn Cys Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys  
 85 90 95  
 Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Lys Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu  
 100 105 110  
 20 Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser  
 115 120 125  
 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly  
 130 135 140  
 25 Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr  
 165 170 175  
 30 Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser  
 180 185 190  
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala  
 195 200 205  
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His  
 210 215 220  
 35 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
 225 230 235 240  
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe  
 245 250 255  
 Gly Leu Leu Lys Leu  
 260

<210> 4  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly  
 20 25 30  
 50 Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln  
 35 40 45  
 Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr  
 50 55 60  
 Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala  
 85 90 95  
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His  
 100 105 110  
 60 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
 115 120 125  
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe  
 130 135 140  
 Gly Leu Leu Lys Leu  
 145

<210> 5  
 <211> 149  
 <212> PRT

```

<213> Callithrix jacchus
<400> 5
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
1 5 10 15
5 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
20 25 30
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
35 40 45
10 Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
50 55 60
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
65 70 75 80
Leu Cys Leu Lys Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
85 90 95
15 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
100 105 110
Leu Gly Gly Ile Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
115 120 125
20 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
130 135 140
Gly Leu Leu Lys Leu
145
<210> 6
<211> 149
25 <212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 6
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
1 5 10 15
30 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
20 25 30
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
35 40 45
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
50 55 60
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
65 70 75 80
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
85 90 95
40 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
100 105 110
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
115 120 125
45 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
130 135 140
Gly Leu Leu Lys Leu
145
<210> 7
<211> 161
50 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Гібридний білок shCD154-His-мітка
<400> 7
55 Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
1 5 10 15
Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
20 25 30
Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
35 40 45
60 Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
50 55 60
Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
65 70 75 80
Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
85 90 95
Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
100 105 110

```

```

Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
      115      120      125
Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
      130      135      140
5  Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
   145      150      155      160
Leu

<210> 8
10 <211> 161
   <212> PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223> Гібридний білок smCD154-His-мітка
15 <400> 8
   Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
   1      5      10      15
   Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
      20      25      30
20  Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
   35      40      45
   Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
   50      55      60
   Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
   65      70      75      80
25  Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
   85      90      95
   Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
      100      105      110
30  Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Ile
   115      120      125
   Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
   130      135      140
   Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
   145      150      155      160
35  Leu

<210> 9
40 <211> 161
   <212> PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223> Гібридний білок scCD154-His-мітка
   <400> 9
45  Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Met Gln Lys Gly
   1      5      10      15
   Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
      20      25      30
50  Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
   35      40      45
   Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
   50      55      60
   Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
   65      70      75      80
55  Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
   85      90      95
   Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
      100      105      110
60  Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
   115      120      125
   Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
   130      135      140
   Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
   145      150      155      160
65  Leu

<210> 10
<211> 6

```

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мітка His6
5 <400> 10
His His His His His His
1 5
<210> 11
<211> 33
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мітка ILZ
<400> 11
15 Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15
Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
20 25 30
Arg
20
<210> 12
<211> 198
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
25 <220>
<223> Гібридний білок shCD154-ILZ
<400> 12
Gly Ser His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln
1 5 10 15
30 Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
20 25 30
Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly
35 40 45
Ser Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
50 55 60
35 Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
65 70 75 80
Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
85 90 95
40 Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
100 105 110
Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
115 120 125
45 Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
130 135 140
Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
145 150 155 160
His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
165 170 175
50 Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
180 185 190
Phe Gly Leu Leu Lys Leu
195
<210> 13
55 <211> 198
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Гібридний білок smCD154-ILZ
60 <400> 13
Gly Ser His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln
1 5 10 15
Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
20 25 30
65 Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly
35 40 45
Ser Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
50 55 60

```

```

Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
65      70      75      80
Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
      85      90      95
5  Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
      100      105      110
Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
      115      120      125
10 Ser Leu Cys Leu Lys Pro Pro Asn Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
      130      135      140
Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
145      150      155      160
His Leu Gly Gly Ile Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
      165      170      175
15 Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
      180      185      190
Phe Gly Leu Leu Lys Leu
      195
<210> 14
20 <211> 198
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> Гібридний білок scCD154-ILZ
25 <400> 14
    Gly Ser His His His His His His Gly Gly Gly Ser Arg Met Lys Gln
    1      5      10      15
    Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
      20      25      30
30 Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly Gly
      35      40      45
Ser Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile
      50      55      60
35 Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys
      65      70      75      80
Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys
      85      90      95
Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val
      100      105      110
40 Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala
      115      120      125
Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg
      130      135      140
45 Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile
      145      150      155      160
His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
      165      170      175
Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
      180      185      190
50 Phe Gly Leu Leu Lys Leu
      195
<210> 15
<211> 277
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens
    <400> 15
    Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
    1      5      10      15
    Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
      20      25      30
60 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
      35      40      45
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
      50      55      60
65 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
      65      70      75      80
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
      85      90      95

```

```

    Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
              100              105              110
    Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
              115              120              125
5   Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
    130              135              140
    Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
    145              150              155              160
    Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
10   165              170              175
    Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
    180              185              190
    Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
    195              200              205
15   Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
    210              215              220
    Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
    225              230              235              240
    Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
20   245              250              255
    Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
    260              265              270
    Val Gln Glu Arg Gln
    275
25   <210> 16
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
30   <223> HCDR1
    <400> 16
    Ser Tyr Ala Ile Ser
    1              5
    <210> 17
35   <211> 5
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> HCDR1
40   <400> 17
    Ser Tyr Gly Ile Ser
    1              5
    <210> 18
    <211> 7
45   <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> HCDR1
    <400> 18
50   Ser Tyr Ser Phe Tyr Trp Gly
    1              5
    <210> 19
    <211> 5
    <212> PRT
55   <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> HCDR1
    <400> 19
    Ala Tyr Tyr Ile His
60   1              5
    <210> 20
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
65   <220>
    <223> HCDR1
    <400> 20
    Asp Tyr Tyr Ile His

```

```

1           5
<210>  21
<211>   7
<212>  PRT
5  <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223>  HCDR1
   <400>  21
Ser Phe Ile Tyr Tyr Trp Gly
10  1           5
   <210>  22
   <211>  17
   <212>  PRT
   <213> Штучна послідовність
15  <220>
   <223>  HCDR2
   <400>  22
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
20  1           5           10           15
   Gly

   <210>  23
   <211>  17
   <212>  PRT
25  <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223>  HCDR2
   <400>  23
Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
30  1           5           10           15
   Gly

   <210>  24
   <211>  17
   <212>  PRT
35  <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223>  HCDR2
   <400>  24
40  Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
   1           5           10           15
   Gly

   <210>  25
   <211>  16
   <212>  PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223>  HCDR2
50  <400>  25
Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
   1           5           10           15
   <210>  26
   <211>  17
55  <212>  PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223>  HCDR2
   <400>  26
60  Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
   1           5           10           15
   Gly

   <210>  27
   <211>  17
   <212>  PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
65

```



```

<223> HCDR2
<400> 27
Arg Phe Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Gly Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
5 Gly

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
10 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR2
<400> 28
Cys Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
15 1 5 10 15

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
20 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR3
<400> 29
Gly Ala Ser Val Trp Asp Gly Pro Ala Glu Val Phe Asp Tyr
25 1 5 10

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR3
<400> 30
Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 31
35 <211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
40 <223> HCDR3
<400> 31
Asp Thr Gly Trp Val Gly Ala Phe Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
45 <211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
50 <223> HCDR3
<400> 32
Leu Gln Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp His
1 5 10

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
55 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR3
<400> 33
Asp Trp Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Pro Gly Tyr Tyr
60 1 5 10 15
Gly Leu Asp Val
20

<210> 34
65 <211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR3

```

```

<400> 34
Glu Gly Glu Leu Ala Gly Ile Phe Phe Asp Tyr
1          5          10
5 <210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> HCDR3
10 <400> 35
Leu Trp Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1          5          10
<210> 36
<211> 17
15 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
<400> 36
20 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ala Ser Ser Asn Asn Glu Asn Phe Leu
1          5          10          15
Ala

<210> 37
25 <211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
30 <400> 37
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1          5          10
<210> 38
<211> 17
35 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
<400> 38
40 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1          5          10          15
Ala

<210> 39
45 <211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
50 <400> 39
Ser Gly Asp Glu Leu Gly Asp Lys Phe Ala Cys
1          5          10
<210> 40
<211> 11
55 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
<400> 40
60 Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Cys
1          5          10
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
65 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
<400> 41

```

```

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val Ser
1          5          10
<210> 42
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR1
<400> 42
10 Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala Cys
1          5          10
<210> 43
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR2
<400> 43
Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser
20 1          5
<210> 44
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR2
<400> 44
Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Ser
30 1          5
<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
35 <220>
<223> LCDR2
<400> 45
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
40 1          5
<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
45 <220>
<223> LCDR2
<400> 46
Gln Glu Asn Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 47
<211> 7
50 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR2
<400> 47
55 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser
1          5
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
60 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> LCDR2
<400> 48
Gln Asp Asp Lys Arg Pro Ser
65 1          5
<210> 49
<211> 7
<212> PRT

```

```

    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> LCDR2
    <400> 49
5   Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
    1           5
    <210> 50
    <211> 7
    <212> PRT
10  <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> LCDR2
    <400> 50
    Tyr Ala Asn Thr Leu Gln Ser
15  1           5
    <210> 51
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
20  <220>
    <223> LCDR3
    <400> 51
    Gln Gln Ala Tyr Thr Thr Pro Phe Thr
25  1           5
    <210> 52
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
30  <223> LCDR3
    <400> 52
    Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp Thr
    1           5
35  <210> 53
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> LCDR3
40  <400> 53
    Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
    1           5
    <210> 54
    <211> 9
45  <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> LCDR3
    <400> 54
50  Gln Ala Trp Asp Ser Asp Thr Ala Val
    1           5
    <210> 55
    <211> 9
    <212> PRT
55  <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> LCDR3
    <400> 55
    Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Val Val
60  1           5
    <210> 56
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
65  <220>
    <223> LCDR3
    <400> 56
    Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val

```

```

1          5
<210>  57
<211>   9
<212>  PRT
5  <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223>  LCDR3
    <400>  57
      Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val
10  1          5
    <210>  58
    <211> 123
    <212>  PRT
    <213> Штучна послідовність
15  <220>
    <223>  VH C4LB5
    <400>  58
      Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
20  1          5          10          15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
      Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
25  Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
      Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80
      Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
30  Ala Arg Gly Ala Ser Val Trp Asp Gly Pro Ala Glu Val Phe Asp Tyr
          100          105          110
      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    <210>  59
35  <211> 118
    <212>  PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223>  VH C4LB89
40  <400>  59
      Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
45  Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
      Gly Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
      Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
50  65          70          75          80
      Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
      Ala Arg Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
55  Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    <210>  60
    <211> 121
    <212>  PRT
60  <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223>  VH C4LB94
    <400>  60
      Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
65  1          5          10          15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
      Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```

```

      35              40              45
Gly Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
  50              55              60
5  Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Asp Thr Gly Trp Val Gly Ala Phe Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
      100              105              110
10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120
<210> 61
<211> 122
<212> PRT
15 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> VH C4LB150
<400> 61
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
20 1              5              10              15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
      20              25              30
Ser Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu
      35              40              45
25 Trp Ile Gly Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50              55              60
Leu Lys Ser Arg Ala Thr Met Ser Val Val Thr Ser Lys Thr Gln Phe
65              70              75              80
Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85              90              95
30 Cys Ala Arg Leu Gln Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp His Trp
      100              105              110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120
35 <210> 62
<211> 129
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
40 <223> VH C4LB189
<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ala Tyr
45      20              25              30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
Gly Arg Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Arg Phe
50      50              55              60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
      85              90              95
55 Ala Arg Asp Trp Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Gly Tyr Phe Gly Pro Gly
      100              105              110
Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
      115              120              125
Ser
60 <210> 63
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
65 <223> VH C4LB191
<400> 63
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15

```

```

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
5  Gly Arg Phe Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Gly Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
10 Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
      85      90      95
Ala Arg Glu Gly Glu Leu Ala Gly Ile Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120
15 <210> 64
    <211> 122
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
20 <223> VH C4LB199
    <400> 64
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1  5  10  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Phe
25 20 25 30
Ile Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Asp
35 35 40 45
Trp Val Gly Cys Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 50 55 60
30 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Pro Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
35 Cys Ala Arg Leu Trp Leu Gly Thr Thr Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
40 <210> 65
    <211> 113
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> VL C4LB5
    <400> 65
45 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1  5  10  15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ala Ser
20 25 30
50 Ser Asn Asn Glu Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
55 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Ala Tyr Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys
60 <210> 66
    <211> 107
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
65 <223> VL C4LB89
    <400> 66
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

```

1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30
5  Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105

<210> 67
15 <211> 113
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> VL C4LB94
20 <400> 67
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20          25          30
25 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35          40          45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50          55          60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
30 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85          90          95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100          105          110
35 Lys

<210> 68
<211> 106
<212> PRT
40 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> VL C4LB150
<400> 68
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
45 1          5          10          15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Glu Leu Gly Asp Lys Phe Ala
20          25          30
Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Trp
35          40          45
50 Gln Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65          70          75          80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asp Thr Ala Val
85          90          95
55 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100          105

<210> 69
<211> 106
60 <212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> VL C4LB189
<400> 69
65 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15
Thr Ala Ser Val Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val
20          25          30

```



Cys Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
           35                  40                  45  
 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                  55                  60  
 5 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile  
    65                  70                  75                  80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gly Thr Val Val  
           85                  90                  95  
 10 Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
           100                  105  
 <210> 70  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 15 <220>  
 <223> VL C4LB191  
 <400> 70  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
    1                  5                  10                  15  
 20 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Val  
           20                  25                  30  
 Ser Trp Asn His Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr  
           35                  40                  45  
 25 Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
    50                  55                  60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
    65                  70                  75                  80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val  
           85                  90                  95  
 30 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
           100                  105  
 <210> 71  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 35 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> VL C4LB199  
 <400> 71  
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
    1                  5                  10                  15  
 40 Thr Val Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Phe Ala  
           20                  25                  30  
 Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Val Val Ile Tyr  
           35                  40                  45  
 45 Gln Asp Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
    50                  55                  60  
 Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
    65                  70                  75                  80  
 50 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val  
           85                  90                  95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
           100                  105  
 <210> 72  
 <211> 107  
 55 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> VL або C4LB235  
 <400> 72  
 60 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
    1                  5                  10                  15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
           20                  25                  30  
 65 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile  
    35                  40                  45  
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
    50                  55                  60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

```

65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
      85          90          95
5  Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105
<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
10 <220>
<223> VL C4LB236
<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
      20      25      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
20 Tyr Tyr Ala Asn Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp
      85      90      95
25 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105
<210> 74
<211> 118
<212> PRT
30 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> VH 5c8
<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
35 1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
40 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
      50      55      60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
45 Thr Arg Ser Asp Gly Arg Asn Asp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
      100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
50 <210> 75
<211> 111
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
55 <223> VL 5c8
<400> 75
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1      5      10      15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
60      20      25      30
Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
      50      55      60
65 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
      65      70      75      80
Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
      85      90      95

```

Glu Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 76  
<211> 321  
5 <212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> κДНК VH C4LB231  
<400> 76

10 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60  
atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actgggtatca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac gccaacagcc tgcagagcgg cgtgcccagc 180  
agattcagcg gcagcggctc cggcaccgac ttaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agcgacagca tcccctggac cttcggccag 300  
15 ggcaccaagg tggaatatca g 321

<210> 77  
<211> 354  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
20 <220>  
<223> κДНК VL C4LB231  
<400> 77

caggtccagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60  
tactgcaagg ccagcggcgg cacccttcagc agctacggca tcagctgggt ccgacaggcc 120  
25 ccaggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcagcccca tcttcggcaa caccaactac 180  
gccsagaaat tccagggcag agtgaccatc accgcccagc agagcaccag caccgcctac 240  
atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgcccgtgt actactgcgc cagaagccgg 300  
tactacggcg acctggacta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtgtc ctct 354

<210> 78  
<211> 387  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
30 <220>  
<223> κДНК VH C4LB191  
<400> 78

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctcag gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaagtg 60  
aagaacacct gcgccagcat gaagggtgtcc tgcaaggcca gcggctacac cttcaccgac 120  
tactacatcc actgggtgctg ccaggcccca ggccagggac tggaatgggt gggacggttc 180  
aaccssaaaca gcggcgacac caacggcgcc cagaaattcc agggcagagt gaccatgacc 240  
40 cgggacacca gcacagcac cgcctacatg gaactgacct ggctgcggag cgacgacacc 300  
gccgtgtacc actgtgccag agagggcgag ctggccggca tcttcttcga ctactggggc 360  
cagggcaccc tgggtgacagt gtccagc 387

<210> 79  
<211> 318  
45 <212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> κДНК VL C4LB191  
<400> 79

agctacgagc tgacccagcc ccccagcgtg tccgtgtctc ctggccagac cgccagcatc 60  
acctgtagcg gcgacaagct gggcgacaaa tacgtgtcct ggaaccacca gaagcccggc 120  
cagagccccg tgctggtgat ctaccaggac cggaagaggc ccagcggcat ccccagagaga 180  
ttcagcggca gcaacagcgg caacaccgcc accctgacca tcagcggcac ccaggccatg 240  
gacgaggccg actactactg ccaggcctgg gacagcagca ccgtggtgtt cggcggaggc 300  
55 accaagctga ccgtgctg 318

<210> 80  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність  
60 <220>  
<223> VH C4LB89 FL mAb на IgG1sigma  
<400> 80

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
65 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

```

    Gly Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
    Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
5   Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
    Ala Arg Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100      105      110
10  Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
      115      120      125
    Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
      130      135      140
    Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
      145      150      155      160
15  Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
      165      170      175
    Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180      185      190
    Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
      195      200      205
20  Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
      210      215      220
    His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Ser Ser
      225      230      235      240
25  Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245      250      255
    Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro
      260      265      270
    Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275      280      285
30  Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
      290      295      300
    Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
      305      310      315      320
35  Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
      325      330      335
    Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
      340      345      350
    Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355      360      365
40  Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370      375      380
    Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
      385      390      395      400
45  Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
      405      410      415
    Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
      420      425      430
50  Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440      445
    <210> 81
    <211> 214
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
55  <220>
    <223> Легкий ланцюг C4LB89
    <400> 81
    Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1      5      10      15
60  Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
      20      25      30
    Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
    Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
65  Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
    Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Ile Pro Trp

```

```

      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
5  Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155
10 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
15 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210
<210> 82
<211> 448
20 <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> VH C4LB89 FL mAb на IgG1sigmaYTE
    <400> 82
25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
    20      25      30
30 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    35      40      45
Gly Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
    65      70      75      80
35 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
Ala Arg Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
    100      105      110
40 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
    115      120      125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130      135      140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
    145      150      155      160
45 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
    165      170      175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
    180      185      190
50 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
    195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210      215      220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Ser Ser
    225      230      235      240
55 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg
    245      250      255
Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro
    260      265      270
60 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
    275      280      285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290      295      300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
    305      310      315      320
65 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
    325      330      335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
    340      345      350

```

```

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355                      360                      365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
      370                      375                      380
5  Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
   385                      390                      395                      400
   Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                        405                      410                      415
10 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
   420                      425                      430
   Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435                      440                      445
<210> 83
<211> 444
15 <212> PRT
   <213> Штучна послідовність
   <220>
   <223> VH C4LB89 FL mAb на IgG2sigma
   <400> 83
20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
   1                      5                      10                      15
   Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                      25                      30
25 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
   35                      40                      45
   Gly Trp Ile Ser Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
   50                      55                      60
   Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
   65                      70                      75                      80
30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85                      90                      95
   Ala Arg Ser Arg Tyr Tyr Gly Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                      105                      110
   Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
   115                      120                      125
35 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
   130                      135                      140
   Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
   145                      150                      155                      160
40 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
   165                      170                      175
   Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
   180                      185                      190
45 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
   195                      200                      205
   Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
   210                      215                      220
   Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe
   225                      230                      235                      240
50 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
   245                      250                      255
   Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
   260                      265                      270
55 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
   275                      280                      285
   Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
   290                      295                      300
   Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
   305                      310                      315                      320
60 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
   325                      330                      335
   Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
      340                      345                      350
65 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
   355                      360                      365
   Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
   370                      375                      380
   Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser

```

```

385          390          395          400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
          405          410          415
5 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
          420          425          430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440
<210> 84
<211> 119
10 <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> VH C4LB119
    <400> 84
15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1          5          10          15
    Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
20 Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    35          40          45
    Gly Ala Ile Asp Pro Tyr Phe Gly Tyr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50          55          60
    Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
    65          70          75          80
25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
    Ala Arg Thr Gly Leu Asn Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
    Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115
30 <210> 85
    <211> 107
    <212> PRT
    <213> Штучна послідовність
35 <220>
    <223> VL C4LB119
    <400> 85
    Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    1          5          10          15
40 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
    20          25          30
    Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
    35          40          45
45 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50          55          60
    Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
    65          70          75          80
    Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
          85          90          95
50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100          105
    <210> 86
    <211> 121
    <212> PRT
55 <213> Штучна послідовність
    <220>
    <223> VH C4LB83
    <400> 86
    Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
    1          5          10          15
60 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
    20          25          30
    Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    35          40          45
65 Gly Trp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50          55          60
    Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
    65          70          75          80

```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Glu Lys Asp Phe Arg Gly Tyr Thr Lys Leu Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110  
5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120  
<210> 87  
<211> 107  
<212> PRT  
10 <213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> VL C4LB83  
<400> 87  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
15 1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Trp  
20 20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
20 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
25 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Phe Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 30 1. Виділене антагоністичне антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка, яке специфічно зв'язує CD154 людини із SEQ ID NO: 1, яке містить область, що визначає комплементарність, важкого ланцюга (HCDR): HCDR1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG) і HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), та область, що визначає
- 35 комплементарність, легкого ланцюга (LCDR): LCDR 1, LCDR2 та LCDR3 із:  
а) SEQ ID NO: 37, 44 і 52 відповідно;  
b) SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно; або  
c) SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно.
- 40 2. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 1, яке містить HCDR1 із SEQ ID NO: 17 (SYGIS), HCDR2 із SEQ ID NO: 23 (WISPIFGNTNYAQKFQG), HCDR3 із SEQ ID NO: 30 (SRYYGDL DY), LCDR1 із SEQ ID NO: 37 (RASQSISSYLN), LCDR2 із SEQ ID NO: 44 (YANSLQS) і LCDR3 із SEQ ID NO: 52 (QQSDSIPWT).
- 45 3. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 1, в якому CD154 являє собою гомотример, і антитіло зв'язує перший мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 182-207 CD154 і другий мономер CD154 у гомотримері в межах амінокислотних залишків 176-253 CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.
- 50 4. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 3, яке зв'язує залишки E182, S185, Q186, A187, P188, S214, A215 і R207 у першому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.
- 55 5. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 3, яке зв'язує залишки T176, F177, C178, Q220, S248, H249, G250 і F353 у другому мономері CD154, де нумерація залишків відповідає SEQ ID NO: 1.
6. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 1, яке містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка щонайменше на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % ідентична SEQ ID NO: 59.
7. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 6, яке містить варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка щонайменше на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 % ідентична SEQ ID NO: 66, 72 або 73.
8. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 7, яке містить VL із SEQ ID NO: 66, 72 або 73.
- 60 9. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 8, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66.



10. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 8, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72.
11. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 9, яке містить VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.
- 5 12. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за будь-яким з пп. 1-2 та 6-11, яке являє собою ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
13. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 12, яке містить щонайменше одну заміну в Fc-області, причому щонайменше одна заміна в Fc-області являє собою заміну L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S або P331S, де нумерація залишків
- 10 відповідає індексу EU.
14. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 13, яке містить заміну L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S в Fc-області, причому нумерація залишків відповідає індексу EU.
- 15 15. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 12, яке містить щонайменше одну заміну в Fc-області, в якому щонайменше одна заміна в Fc-області являє собою заміну V234A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S або P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.
16. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 15, яке містить заміну V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S в Fc-області, де нумерація залишків відповідає індексу
- 20 EU.
17. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 12, яке містить важкий ланцюг (HC) і легкий ланцюг (LC) із SEQ ID NO:
  - а) 80 і 81 відповідно;
  - б) 82 і 81 відповідно; або
  - 25 в) 83 і 81 відповідно.
18. Виділене антагоністичне антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, яке містить:
  - а) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23, 30, 37, 44 і 52
  - 30 відповідно;
  - б) VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 66; або
  - в) важкий ланцюг із SEQ ID NO: 80 і легкий ланцюг із SEQ ID NO: 81.
19. Полінуклеотид, який кодує VH антитіла з SEQ ID NO: 59 і VL антитіла з SEQ ID NO: 66, 72 або 73.
20. Полінуклеотид, який містить полінуклеотидну послідовність із SEQ ID NO: 76 або 77.
- 35 21. Полінуклеотид, який кодує VH антитіла з SEQ ID NO: 59 і VL антитіла з SEQ ID NO: 66.
22. Вектор, що містить полінуклеотид за пп. 19, 20 або 21.
23. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 22.
24. Спосіб отримання виділеного антагоністичного антитіла, або його антигензв'язуючої ділянки, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, який включає культивування клітини-хазяїна за
- 40 п. 23 в умовах, за яких відбувається експресія антитіла, і виділення антитіла, виробленого клітиною-хазяїном.
25. Виділене антагоністичне антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, яке містить а) HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30
- 45 відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 49 і 52 відповідно; або б) VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 72.
26. Виділене антагоністичне антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка, яке специфічно зв'язує CD154 із SEQ ID NO: 1, яке містить а) HCDR1, HCDR2 і HCDR3 із SEQ ID NO: 17, 23 і 30
- відповідно і LCDR1, LCDR2 і LCDR3 із SEQ ID NO: 37, 50 і 52 відповідно; або б) VH із SEQ ID NO: 59 і VL із SEQ ID NO: 73.
- 50 27. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за будь-яким з пп. 25-26, яке являє собою ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
28. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 27, яке містить щонайменше одну заміну в Fc-області, в якому щонайменше одна заміна в Fc-області являє собою заміну L234A, L235A, G237A, P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, A330S або P331S, де нумерація залишків
- 55 відповідає індексу EU.
29. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 28, яке містить заміну L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S і P331S в Fc-області, причому нумерація залишків відповідає індексу EU.
30. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 27, яке містить щонайменше одну заміну в Fc-області, в якому щонайменше одна заміна в Fc-області являє собою заміну V234A, G237A,
- 60

P238S, M252Y, S254T, T256E, H268A, V309L, A330S або P331S, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

31. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за п. 30, яке містить заміну V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S і P331S в Fc-області, де нумерація залишків відповідає індексу EU.

32. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за будь-яким з пп. 1-2, 6-18 і 25-31, яке є мультиспецифічним.

33. Антитіло, або його антигензв'язуюча ділянка за будь-яким з пп. 1-2, 6-18 і 25-31, яке має щонайменше одну з таких властивостей:

а) імунний комплекс антитіла й розчинного CD154 людини (shCD154) не активує тромбоцити, причому активацію тромбоцитів вимірюють за експресією Р-селектину на поверхні тромбоцитів;  
б) зв'язується з CD154 із константою дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $5 \times 10^{-9}$  М або менше за результатами вимірювання  $K_D$  із використанням системи ProteOn XPR36 за 25 °С у фосфатно-сольовому буферному розчині Дульбекко, який містить 0,03 % полісорбату Р20 і 100 мкг/мл альбуміну бичачої сироватки;

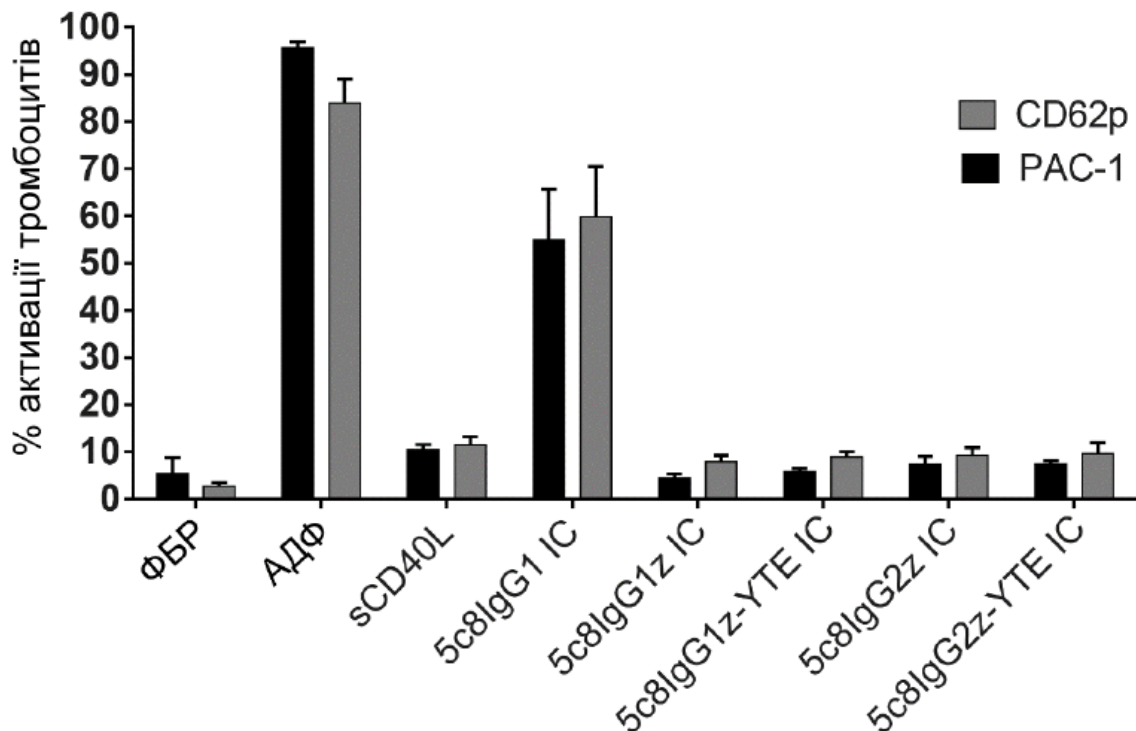
с) інгібує опосередковану CD154 проліферацію В-клітин людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,7 \times 10^{-9}$  М або менше; або

д) інгібує опосередковану CD154 експресію секретованої ембріональної лужної фосфатази (SEAP) під керуванням NF- $\kappa$ B-індуцибельного інтерферон- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) мінімального промотора в клітинах HEK293, які стабільно експресують SEAP і CD40 людини зі значенням  $IC_{50}$  приблизно  $2,1 \times 10^{-8}$  М або менше.

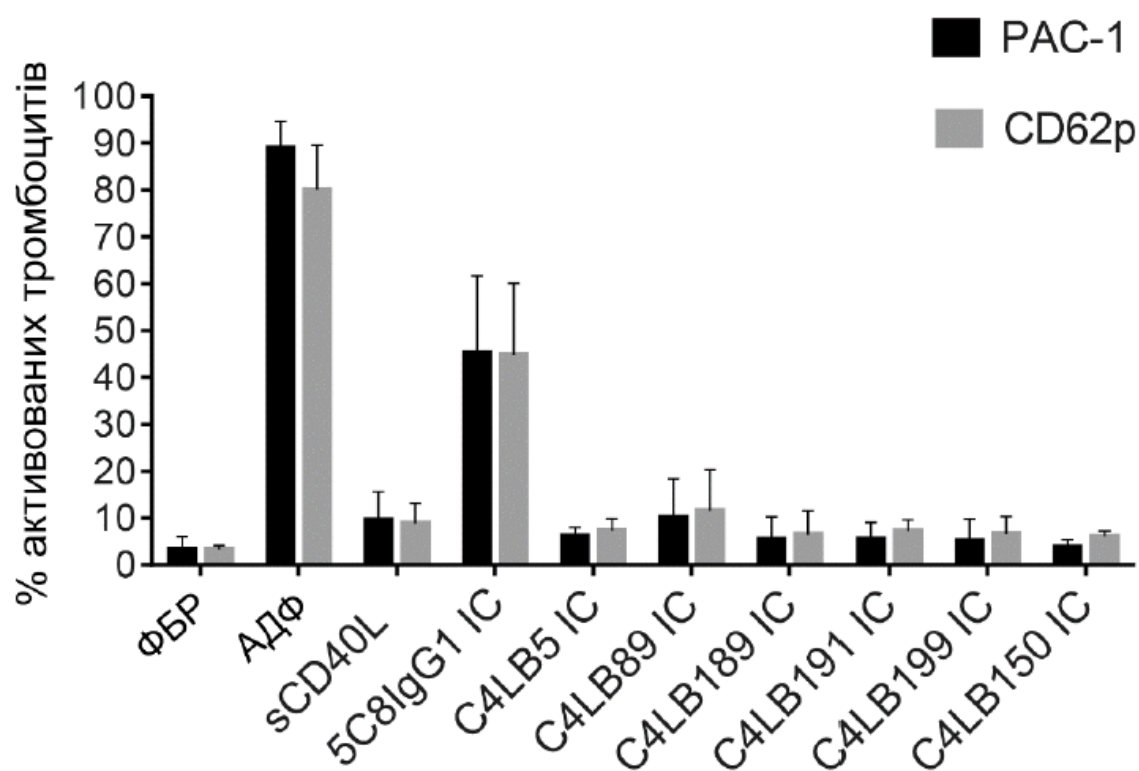
34. Імунокон'югат, який містить антитіло, або його антигензв'язуючу ділянку за будь-яким з пп. 1-2, 6-18 і 25-31, зв'язане з терапевтичним агентом або візуалізуючим агентом.

35. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло, або його антигензв'язуючу ділянку, за будь-яким з пп. 1-2, 6-18 і 25-33, або імунокон'югат за п. 34 і фармацевтично прийнятний носій.

Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

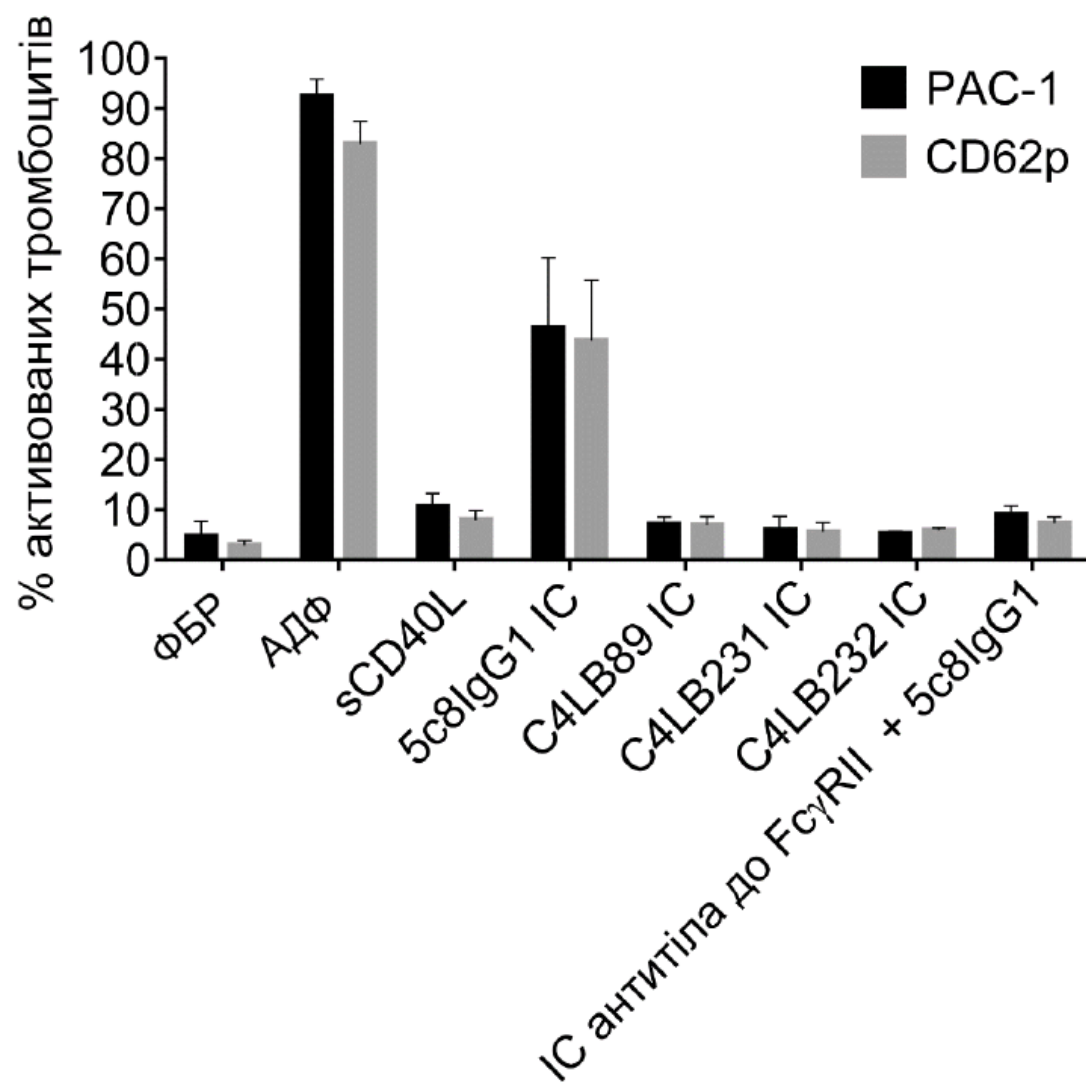
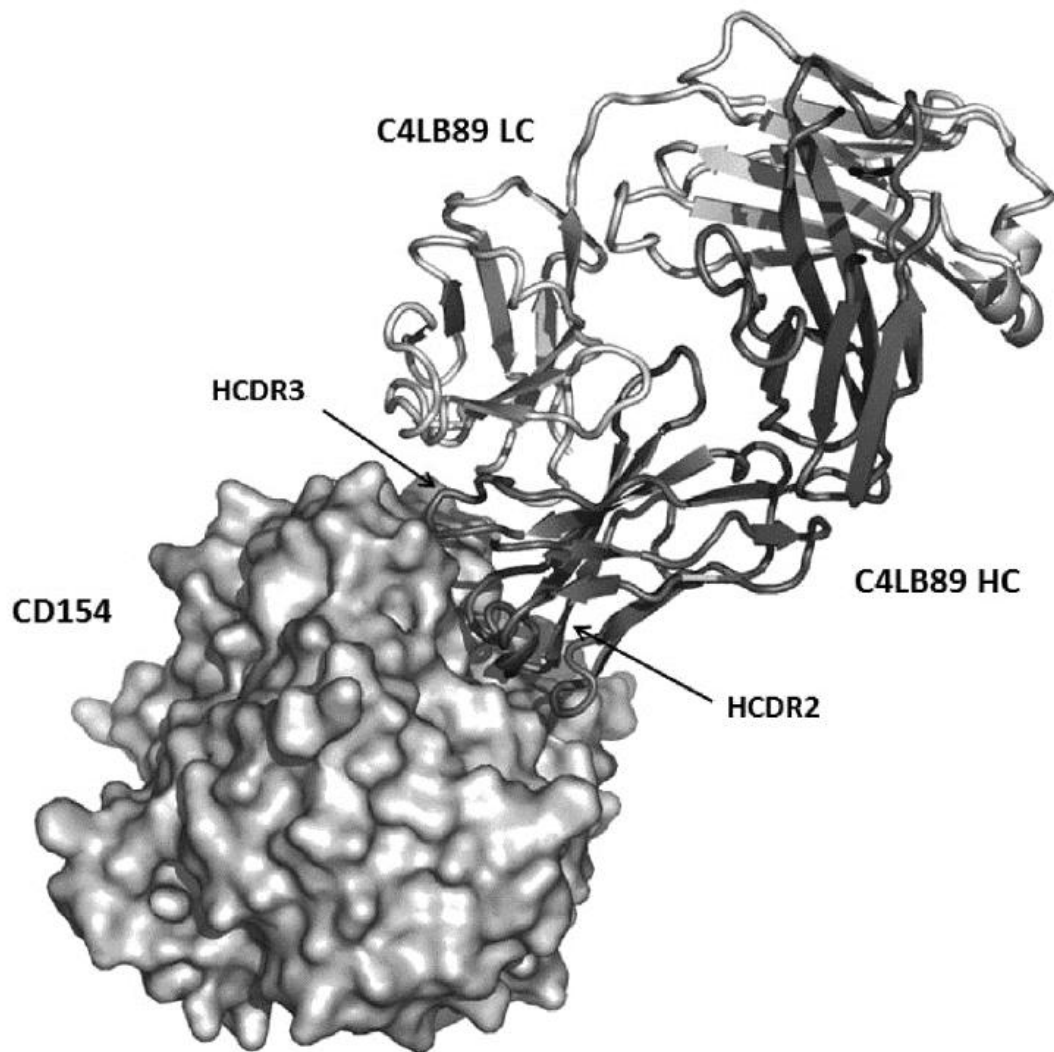


Fig. 4



Фиг. 5

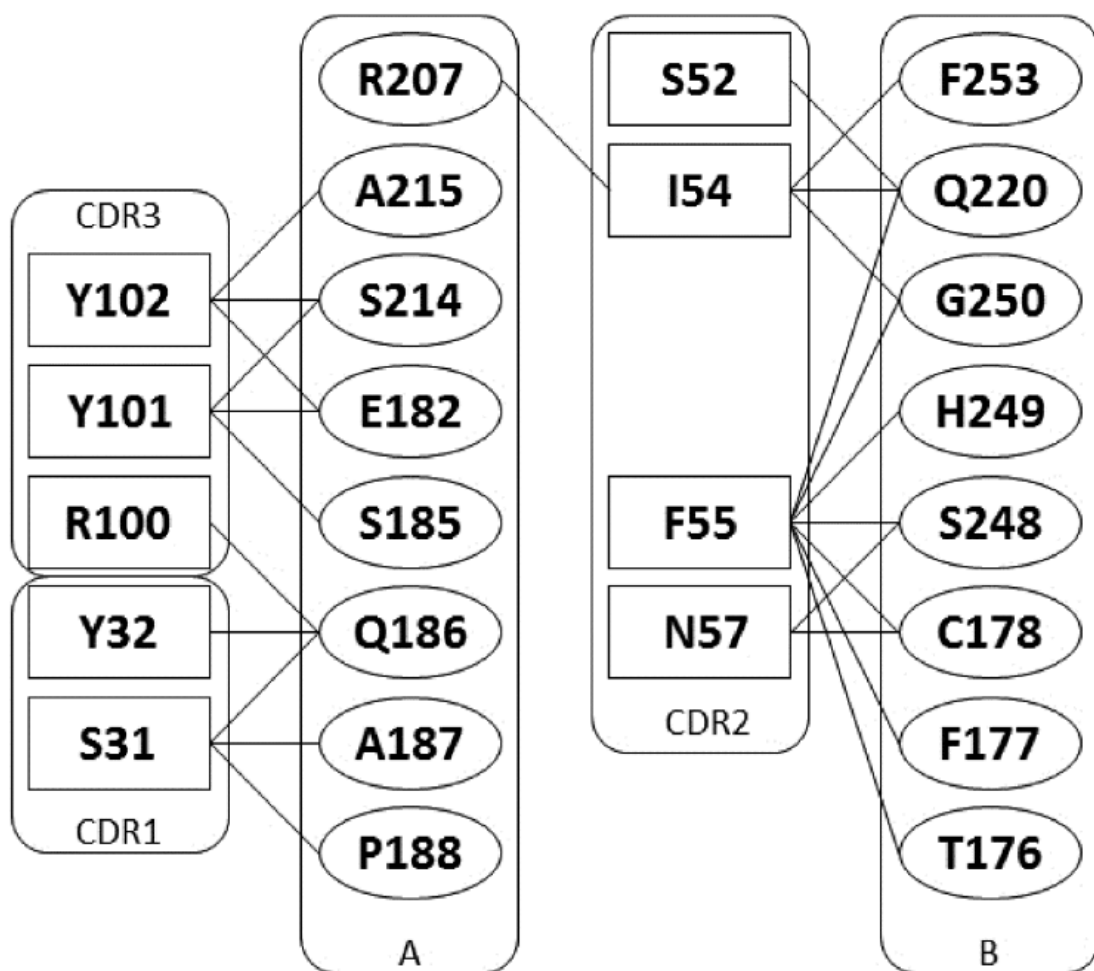


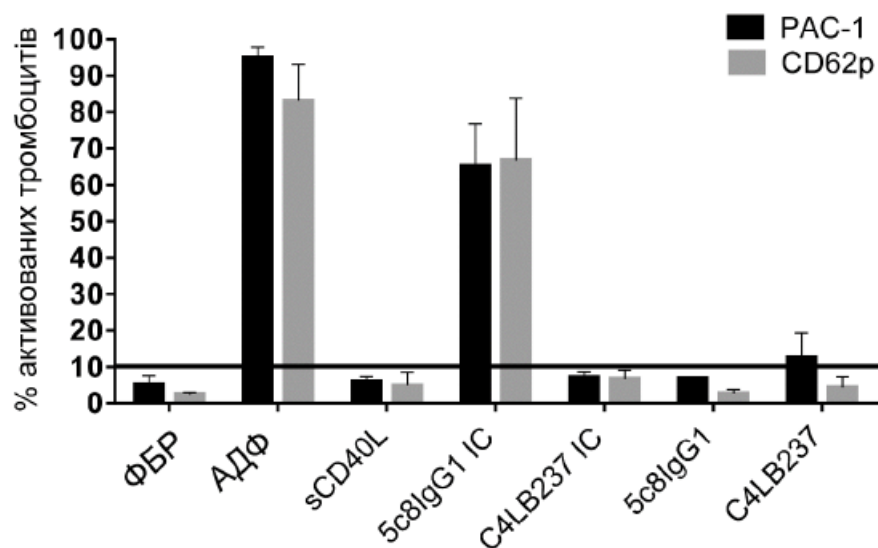
Fig. 6A

	1	30
Людини	MIETYNQTS	PRSAATGLPI
Мавпи-ігрунки	MIETYNQPV	PRSAATGPPV
	*****.	***** *;*****
	31	60
Людини	FLITQMIGS	ALFAVYLHRRLDKIEDERNLH
Мавпи-ігрунки	FLITQMIGS	ALFAVYLHRRLDKIEDERNLH
	*****	
	61	90
Людини	EDFVFMKTI	QRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ
Мавпи-ігрунки	EDFVFMKTI	QRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ
	*****	
	91	120
Людини	FEGFVKDIM	LNKEETKKENSFEMQKGDQNP
Мавпи-ігрунки	FEGFVKDIM	LNKEEKKENSFEMQKGDQNP
	*****.	
	121	150
Людини	QIAAHVISE	ASSKTTSVLQWAEKGYTMSN
Мавпи-ігрунки	QIAAHVISE	ASSKTTSVLQWAEKGYTMSN
	*****	
	151	180
Людини	NLVTLENGK	QLTVKRQGLYYIYAQVT <u>F</u> C <u>S</u> N
Мавпи-ігрунки	NLVTLENGK	QLTVKRQGLYYIYAQVT <u>F</u> C <u>S</u> N
	*****	

Фіг. 6В

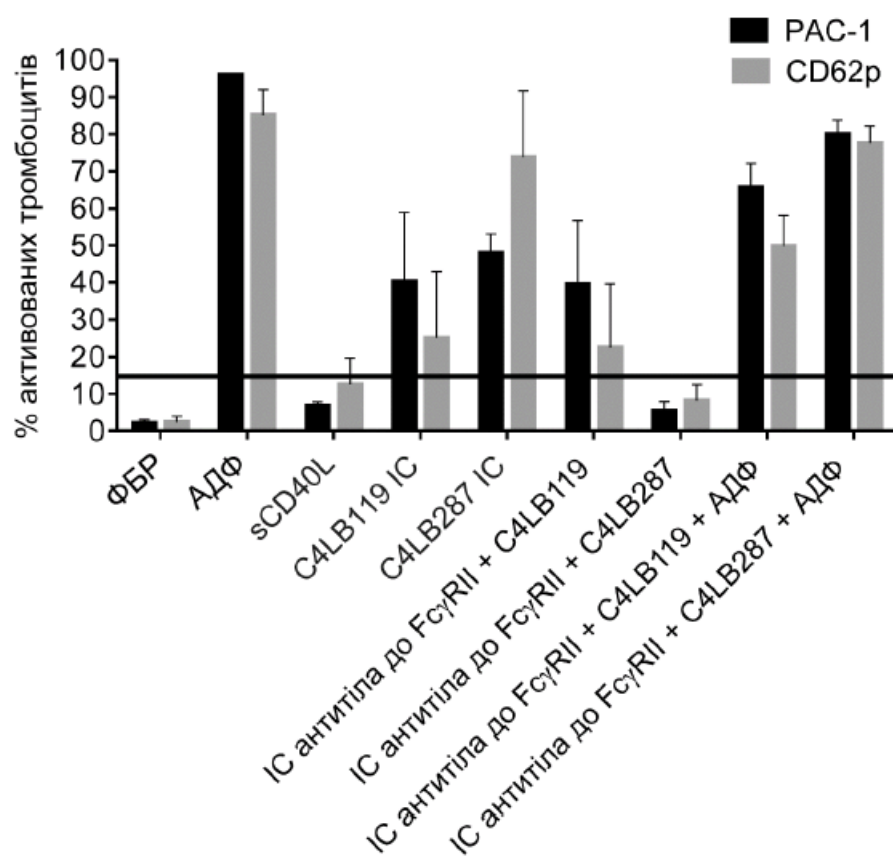
	181	210
Людини	REASSQAPFFIASLCLKSPGRFERILLRAAN	
Мавпи-ігрунки	REASSQAPFFIASLCLKPPNRFERILLRAAN	
	*****.*.******	
	211	240
Людини	THSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN	
Мавпи-ігрунки	THSSAKPCGQQSIHLGGIFELQPGASVFN	
	*****:*****	
	241	261
Людини	VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL	
Мавпи-ігрунки	VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL	
	*****	

Фіг. 7

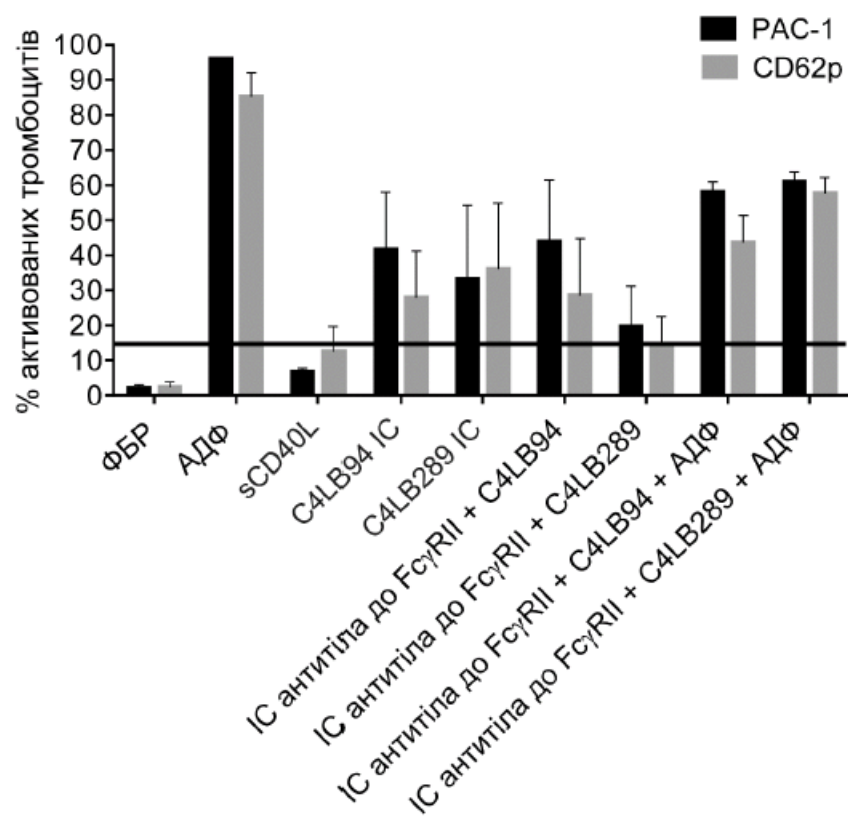




Фиг. 8А



Фіг. 8В



Фіг. 8С

