

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048273**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.14

(21) Номер заявки
202191359

(22) Дата подачи заявки
2019.11.18

(51) Int. Cl. *A61P 35/02* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К CD40 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/769,514**

(32) **2018.11.19**

(33) **US**

(43) **2021.10.21**

(86) **PCT/US2019/062011**

(87) **WO 2020/106620 2020.05.28**

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

(72) Изобретатель:
**Ямнюк Аарон (CA), Стратерс Мэри,
Кристек Стэнли Р., Найеем Акбар,
Ракестро Джинджер (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М. (RU)**

(56) **WO-A1-2016196314
WO-A1-2017004006**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают CD40, включая гуманизированное антитело. Антитела связывают CD40 и не проявляют агонистической активности в отношении CD40. Антитела могут содержать модифицированный Fc-домен IgG1 и характеризоваться минимальной активацией незрелых дендритных клеток. Представлены композиции, содержащие антитела, способы применения для лечения заболеваний, в развитие которых вовлечена активность CD40, и применение в получении лекарственного препарата для лечения заболевания, в развитие которого вовлечена активность CD40.

B1

048273

048273

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 62/769514, поданной 19 ноября 2018 г., которая включена в настоящий документ во всей своей полноте во всех отношениях.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII, и он включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 13 ноября 2019 г., имеет название 200896-0015-00-WO-592417_SL.txt, и ее размер составляет 170111 байт.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее раскрытие относится к антителам, которые связывают CD40. Полипептиды антител связывают CD40 и не проявляют агонистической активности в отношении CD40. Антитела могут содержать модифицированный Fc-домен IgG1 и характеризоваться минимальной активацией незрелых дендритных клеток. Представлены композиции, содержащие антитела, способы применения для лечения заболеваний, в развитие которых вовлечена активность CD40, и применение в получении лекарственного препарата для лечения заболевания, в развитие которого вовлечена активность CD40.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения CD40 представляет собой костимулирующую молекулу, принадлежащую к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), которая присутствует на поверхности антигенпредставляющих клеток (APC), включая дендритные клетки, В-клетки и макрофаги. APC активируются при связывании CD40 с его лигандом, CD154 (CD40L), на поверхности T_H-клеток. CD40-опосредованная активация APC вовлечена в целый ряд иммунных реакций, включая выработку цитокинов, положительную регуляцию костимулирующих молекул (таких как CD86) и повышенный уровень представления антигенов и пролиферации В-клеток. CD40 также может экспрессироваться эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками, фибробластами и эпителиальными клетками.

Активация CD40 также вовлечена в целый ряд нежелательных Т-клеточных ответов, относящихся, например, к аутоиммунным реакциям, отторжению трансплантата или аллергических реакций. Одной из стратегий контроля нежелательных Т-клеточных ответов является целенаправленное воздействие на CD40 с использованием антагонистического антитела. Например, моноклональное антитело HCD122 (лукатумумаб), ранее известное как Chiron 1212, в настоящее время является объектом клинических испытаний в отношении лечения определенных CD40-опосредованных воспалительных заболеваний. См. "Study of HCD122 (Lucatumumab) and Bendamustine Combination Therapy in CD40⁺ Rituximab-Refractory Follicular Lymphoma," Clinical Trials Feeds, в интернете согласно протоколу передачи гипертекста: clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01275209 (последнее обновление 11 января 2011 года). Однако моноклональные антитела могут характеризоваться и агонистической активностью. Например, эффективность антитела к CD40, Chi220, ограничена его слабым стимулирующим потенциалом. См. Adams, et al., "Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival," J. Immunol. 174: 542-50 (2005).

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно первому варианту осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем: вариабельная область тяжелой цепи содержит одно из следующего: (i) CDR1, содержащая SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащая QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, содержащая WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и (ii) CDR1, содержащая SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащая QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12), CDR3, содержащая WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем: вариабельная область тяжелой цепи содержит одно из следующего: (i) CDR1, состоящая из SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, состоящая из QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, состоящая из WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и (ii) CDR1, состоящая из SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, состоящая из QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12), CDR3, состоящая из WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, состоящую из KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, состоящую из SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, состоящую из QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем: вариабельная область тяжелой цепи содержит одно из следующего: (i) CDR1, состоящая из SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, состоящая из QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, состоящая из WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и (ii) CDR1, состоящая из SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, состоящая из QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12), CDR3, состоящая из WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, состоящую из KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, состоящую из SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, состоящую из QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

вающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем:

вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, состоящую из SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, состоящую из QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, состоящую из WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3);

и вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, состоящую из KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, состоящую из SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, состоящую из QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем: вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTT
GRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 4)

и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность
DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVP

SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10).

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPSQ
GRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 13)

и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVSTAVAWYQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIP

ARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, причем антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTT
GRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 4)

и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVSTAVAWYQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIP

ARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат первую часть полипептида, содержащую константную область тяжелой цепи человека; и вторую часть полипептида, содержащую константную область легкой цепи человека. Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий либо (1) мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR; либо (2) замену аланина в положении 297 по Kabat.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR. Согласно определенным вариантам осуществления P238 подвергнут мутации с заменой на лизин.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 22; IgG1-P238K (-C-концевой Lys)),
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:23; IgG1-P238K),

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 24; CH1-IgG1-P238K (-C-
 концевой Lys)),

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25; CH1-IgG1-P238K),
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO: 26; IgG1f-P238K (-C-концевой Lys)),
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 27; IgG1f-P238K),

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 28; CH1-IgG1f-P238K (-C-
 концевой Lys)),

или

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No: 29; CH1-IgG1f-P238K).

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе выделенное

антитело или его антигенсвязывающая часть содержат Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий либо (1) мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR; либо (2) замену аланина в положении 297 по Kabat, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащую QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, содержащую WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен IgG1 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных в настоящем документе выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, первая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QINPTT**
GRSQYNEKFKTRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLQPFAY**WGQGTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGK**S**
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK**S**
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-CH1-
 IgG1-P238K-

без концевого лизина),

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QINPTT**
GRSQYNEKFKTRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLQPFAY**WGQGTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGK**S**
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK**S**
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6; HC_Y12XX-hz28-CH1-
 IgG1-P238K-

с концевым лизином),

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QINPTT**
GRSQYNEKFKTRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLQPFAY**WGQGTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGK**S**
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK**S**
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 30; HC_Y12XX-hz28-CH1-
 IgG1f-P238K-

без концевого лизина), и

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QINPTT**

GRSOYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCAR~~**WGLOPFAY**WGQGL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSK
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31; HC_Y12XX-hz28-CH1-
 IgG1f-P238K-

с концевым лизином), или состоит из нее; и

вторая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITC**KASQDVSTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC**QOHYSTPWT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNFPYKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL),

или состоит из нее.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанных в настоящем документе выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, первая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QI**

NPTTGRSOYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCAR~~**WGLOPFAY**WG
 QGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
 AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1-P238K-

без концевого лизина), или состоит из нее; и

вторая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITC**KASQDVSTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYC**QOHYSTPWT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNFPYKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLTK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL),

или состоит из нее.

Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий замену аланина в положении 297 по Kabat.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, могут оказывать антагонистическое действие в отношении типов активности CD40. Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой химерное антитело. Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой гуманизированное антитело. Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать константную область тяжелой цепи человека и константную область легкой цепи человека.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой антигенсвязывающую часть, выбранную из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, диател и scFv-Fc. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, представляют собой scFv-Fc.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть соединены с терапевтическим средством.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть соединены со вторым функциональным фрагментом, характеризующимся специфичностью связывания, отличной от таковой указанных антитела или его антигенсвязывающей части.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут также содержать дополнительный фрагмент.

В настоящем документе раскрыта молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антигено или его антигенсвязывающую часть. В настоящем документе раскрыт вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты. Также предусматривается клетка, трансформированная вектором экспрессии. Также раскрыт способ получения антитела к CD40 человека или его антигенсвязывающей части, предусматривающий:

а) обеспечение экспрессии антитела или его антигенсвязывающей части в клетке, трансформированной вектором экспрессии, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую раскрытые в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть; и

б) выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая: а) раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающую часть; и б) фармацевтически приемлемый носитель.

Представлен способ лечения или предупреждения иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение субъекту раскрытых в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающей части. Дополнительно представлен способ лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту раскрытых в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающей части. Необязательно антитело или его антигенсвязывающую часть вводят с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. Введение может быть одновременным или последовательным. Иллюстративное средство представляет собой молекулу мутантного CTLA4, такую как L104EA29Y-Ig (белатацепт). В таком способе лечения или предупреждения иммунной реакции у субъекта и в таком способе лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у субъекта, предпочтительно у субъекта наблюдается заболевание, выбранное из группы, состоящей из: болезни Аддисона, форм аллергии, анафилаксии, анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, атопической аллергии, аутоиммунных заболеваний органов слуха, аутоиммунных заболеваний органов зрения, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного паротита, бронхиальной астмы, коронарной болезни сердца, болезни Крона, сахарного диабета, эпидидимита, гломерулонефрита, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, воспалительного заболевания кишечника, иммунной реакции на рекомбинантные лекарственные препараты (например, фактор VII у лиц, страдающих гемофилией), волчаночного нефрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, пузырчатки, псориаза, ревматической атаки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, спондилоартропатий, тиреоидита, отторжения трансплантата, васкулита и язвенного колита.

Также предусматриваются антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Дополнительно предусматриваются антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, или содержащий их лекарственный препарат, для применения в лечении нуждающегося в этом субъекта. Дополнительно предусматриваются антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, в терапевтически эффективном количестве, для применения в лечении или предупреждении иммунной реакции, причем антитело или его антигенсвязывающая часть предназначены для введения нуждающемуся в этом пациенту.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1, включающей фиг. 1A-1D, показаны данные SPR-сенсограммы по связыванию антител с FcγR человека. На фиг. 1A показаны данные для контрольного антитела, контрольное IgG1. На фиг. 1B показаны данные для Y12XX-hx28-IgG1-P238K, контрольное IgG1. На фиг. 1C показаны данные для контрольного антитела, антитела В. Фиг. 1D представляет собой таблицу, в которой приведены значения KD для взаимодействий антитело/FcγR. Значения KD получали либо с помощью аппроксимации к ленгмюровской модели связывания 1:1 (hCD64), либо к равновесной модели связывания 1:1 (hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 и hCD16a-F158).

На фиг. 2, включающей фиг. 2A-2C, показаны данные по активации iDC для обработки iDC гуманизированными антителами Y12XX или контрольными антителами с добавлением CD32a-экспрессирующих клеток СНО, или без него. Оценивали повышение IL-6 (интерлейкин-6) в среде для культивирования клеток и уровня экспрессии маркеров клеточной поверхности, на которое указывают значения средней интенсивности флуоресценции в проточной цитометрии при окрашивании антителами к CD86 и CD54. На фиг. 2A показаны данные для IL-6. На фиг. 2B показаны данные для CD86. На фиг. 2C показаны данные для CD54. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) представлена по оси Y как на фиг. 2B, так на и фиг. 2C. Каждый символ соответствует данным для iDC от отдельного донора. Y12XX-hz42-P238K тестировали в клетках от 4 доноров, Y12XX-hz40-P238K тестировали в клетках от 6 доноров и Y12XX-hz28-P238K тестировали в клетках от 10 доноров. Концентрация антитела указана в мкг/мл (10, 30, или 100 мкг/мл). Включение клеток СНО-CD32 в анализ, как указано, обеспечивает FcγR-опосредованное перекрестное связывание или кластеризацию. Луб-IgG применяли в качестве отрицательного контроля. Частичный агонист CD40 2141 и BMS986090-100 применяли в качестве положительных контролей.

На фиг. 3, включающей фиг. 3А и 3В, показаны иллюстративные данные из анализа комплементзависимой цитотоксичности (CDC) для гуманизированных антител Y12XX, антител к CD40 и контрольных антител. CDC-анализ осуществляли два раза. Во втором анализе применяли свежеразмороженную сыворотку крови человека, содержащую комплемент. На фиг. 3А показаны данные для первой итерации анализа, а на фиг. 3В показаны данные для второй итерации анализа.

На фиг. 4, включающей фиг. 4А и 4В, показаны иллюстративные данные из анализа антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) для гуманизированных антител Y12XX или контрольных антител, с применением CD14⁺ моноцитов от двух разных доноров в качестве эффекторных клеток. На фиг. 4А показаны данные, полученные при использовании CD14⁺ моноцитов от донора № 8 в качестве эффекторных клеток. На фиг. 4В показаны данные, полученные при использовании CD14⁺ моноцитов от донора № 65 в качестве эффекторных клеток.

На фиг. 5, включающей фиг. 5А и 5В, показаны иллюстративные данные из анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) для гуманизированных антител Y12XX или контрольных антител, с применением NK-клеток от двух разных доноров в качестве эффекторных клеток. На фиг. 5А показаны данные, полученные при использовании NK-клеток от донора № 38 в качестве эффекторных клеток. На фиг. 5В показаны данные, полученные при использовании NK-клеток от донора № 55 в качестве эффекторных клеток.

На фиг. 6, включающей фиг. 6А, 6В, 6С и 6D, показаны данные из анализа, разработанного для оценки NF-κB/AP-1-индуцируемой активности SEAP на клетках Ramos Blues при стимуляции разными антителами к CD40. Репрезентативные результаты из трех независимых исследований по активности CD40 mAb показаны на фиг. 6А и 6В. На фиг. 6С и 6D показаны данные для положительного контроля, CD40L-IZ. AIMV: среда AIM VTM (1×) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится к антителам к CD40, и, в частности, антагонистическим антителам к CD40. В случае терапевтических мишеней, таких как CD40, FcγR-опосредованное перекрестное связывание антител к CD40 может потенциально приводить к нежелательной передаче сигнала с участием агонистов и потенциальной токсичности. В настоящем раскрытии также описаны антагонистические антитела к CD40 со сниженной способностью к взаимодействию с "низкоаффинными" FcγR: hCD32a/FcγRIIa, hCD32b/FcγRIIb и hCD16a/FcγRIIIa, а также сниженной способностью к взаимодействию с "высокоаффинным" FcγR hCD64. Ожидается, что сниженная способность к взаимодействию с низкоаффинными FcγR обеспечит снижение вероятности нежелательной передачи сигнала с участием агонистов и нежелательной потенциальной токсичности.

Определения и сокращения

Ниже приведены дополнительные сокращения и определения.

APC	антигенпредставляющие клетки
CD54	также называемый ICAM-1
CDR	определяющие комплементарность области
C _H или CH	константная область тяжелой цепи
C _L или CL	константная область легкой цепи
Клетка CHO	клетка яичника китайского хомячка
dAb	однодоменное антитело
DC	дендритная клетка
FcγR	взаимозаменяемо с FcγR
FcγR	Fc-гамма рецептор
FR	каркасная область
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HC	тяжелая цепь
ICAM-1	молекула 1 межклеточной адгезии
iDC	незрелые дендритные клетки

IFN	интерферон
IgG	иммуноглобулин
IL-6	интерлейкин-6
LC	легкая цепь
mAb	моноклональное антитело
мг	миллиграмм
мл	миллилитр
нг	нанограмм
нМ	наномолярный
pI	изоэлектрическая точка
SPR	поверхностный плазмонный резонанс
TNF	фактор некроза опухоли
мкг	микрограмм
мкМ	микромольный
V _L или VL	вариабельный домен легкой цепи
V _k или VK	вариабельный домен легкой каппа-цепи
V _H или VH	вариабельный домен тяжелой цепи

Следующие сокращения и определения применяются в соответствии с настоящим подробным описанием. Следует отметить, что в контексте настоящего документа формы единственного числа включают их множественное число, если контекстом явно не указано иное. Таким образом, ссылка на "антитело" включает множество таких антител, а ссылка на "дозировку" включает ссылку на одну или несколько дозировок и их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и так далее.

В контексте настоящего документа термин "приблизительно" понятен специалистам в данной области, и он может до некоторой степени варьироваться в зависимости от контекста, в котором он применяется. Обычно термин "приблизительно" охватывает диапазон значений, которые составляют плюс/минус 10% от упомянутого значения, если в настоящем описании не указано иное.

Следует понимать, что в настоящий документ включены любые возможные все целые числа в указанных диапазонах или их часть.

CD40 также известен и упоминается как поверхностный антиген В-клеток CD40, Bp50, рецептор CD40L, CDw40, CDW40, MGC9013, p50, TNFRSF5 и член 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. "CD40 человека" относится к CD40, содержащему следующую аминокислотную последовательность:

```
MVRLPLQCVL  WGCLLTAVHP  EPPTACREKQ  YLINSQCCSL  CQPGQKLVSD  STEFTETECL
PCGESEFLDT  WNBRETHCHQH  KYCDPNLGLR  VQKGTSETD  TICTCEEGWH  CTSEACESCV
LHRSCSPGFG  VKQIATGVSD  TICEPCVGF  FSNVSSAFEK  CHPWTSCEK  DLVVQQAGTN
KTDVVCQPQD  RLRALVVIPI  IFGILFAILL  VLVFIKVKAK  KPTNKAPHPK  QEPQEIINFPD
DLPGSNTAAP  VQETLHGCP  VTQEDGKESR  ISVQERQ (SEQ ID NO: 20).
```

В контексте настоящего документа термин "вариабельный домен" относится к вариабельным доменам иммуноглобулинов, определенным по Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th ed., U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991). Нумерация и положение аминокислотных остатков CDR в пределах вариабельных доменов представлены в соответствии с хорошо известной системой нумерации по Kabat. VH, "вариабельная область тяжелой цепи" и "вариабельный домен тяжелой цепи" относятся к вариабельному домену тяжелой цепи. VL, "вариабельная область легкой цепи" и "вариабельный домен легкой цепи" относятся к вариабельному домену легкой цепи.

Термин "человека", применительно к антителам, означает, что антитело имеет последовательность, например, FR- и/или CH-доменов, происходящую из иммуноглобулина человека. Последовательность "происходит из" кодирующей последовательности иммуноглобулина человека, если последовательность: (a) выделена из организма человека или клетки или клеточной линии человека; (b) выделена из библиотеки последовательностей клонированных генов антител человека или последовательностей вариабельных доменов антител человека; или (c) диверсифицирована с помощью мутации и отбора из одного или нескольких из вышеприведенных полипептидов.

"Выделенное" соединение в контексте настоящего документа означает, что соединение отделено по меньшей мере от одного компонента, с которым оно естественным образом ассоциировано в природе.

Антитело к CD40 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, каждая из которых содержит три определяющие комплементарность области (CDR) и четыре карманные области (FR), расположенные, от amino-конца к карбокси-концу, в

следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном и в первую очередь отвечают за распознавание антигена.

Антитело к CD40 по настоящему изобретению может содержать CDR гуманизированного антитела Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2), Y12XX-hz40 (Vh-hz12; Vk-hz3) или Y12XX-hz42 (Vh-hz14; Vk-hz3). Обзор аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи представлен в табл. 1. Таблица включает сокращенное название и более подробное название для каждой аминокислотной последовательности, а также идентификаторы последовательностей.

Таблица 1

Антитело	Варибельная область HC	Варибельная область LC
Y12XX-hz28	Vh-hz14 (Y1268_IGHV1.6908-S54T-N55T-Vh) (SEQ ID NO: 4)	Vk-hz2 (Y1258_IGKV1.3902-Vk) (SEQ ID NO: 10)
Y12XX-hz40	Vy-hz12 (Y1268_IGHV1.6908-N55Q-Vh) (SEQ ID NO: 13)	Vk-hz3 (Y1258_IGKV3.1501-Vk) (SEQ ID NO: 16)
Y12XX-hz42	Vh-hz14 (Y1268_IGHV1.6908-S54T-N55T-Vh) (SEQ ID NO: 4)	Vk-hz3 (Y1258_IGKV3.1501-Vk) (SEQ ID NO: 16)

Согласно конкретному варианту осуществления антитела к CD40 по настоящему изобретению содержат CDR гуманизированного антитела Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2). Подробности касательно аминокислотных последовательностей Y12XX-hz28 представлены в табл. 2.

Таблица 2

Последовательности Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2)

Варибельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT <u>SYWMH</u> WVRQ APGQGLEWMGQ <u>INPTTGRSQYNEKF</u> TRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>WGLQPFAY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 4)	Vh-hz14 (SEQ ID NO: 4; CDR подчеркнуты)
VH-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	Аминокислоты 31-35 SEQ ID NO: 4
VH-CDR2	QINPTTGRSQYNEKF (SEQ ID NO: 2)	Аминокислоты 50-66 SEQ ID NO: 4
VH-CDR3	WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3)	Аминокислоты 99-106 SEQ ID NO: 4

<p>HC_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K (представляет собой IgG1 с C-концевым лизином и без него)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT<u>SYWMH</u>WVRQ APGQGLEWMGQINPTTGRSOYNEKFKTRVITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR<u>WGLQPFAY</u>WGQGLTIVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGK<u>SVFL</u>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT<u>SYWMH</u>WVRQ APGQGLEWMGQINPTTGRSOYNEKFKTRVITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR<u>WGLQPFAY</u>WGQGLTIVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGK<u>SVFL</u>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)</p>	<p>CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1- P238K = аминокислоты 216-446; P238K подчеркнута; без C-концевого лизина</p> <p>CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1- P238K = аминокислоты 216-447; P238K подчеркнута; C-концевой лизин присутствует</p>
<p>Вариабельная область легкой цепи</p>	<p>DIQMTQSPSFLSASVGDRTITC<u>KASQDVSTAVA</u>WYQQK PGKAPKLLIY<u>SASYRYT</u>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC<u>QQHYSTPWT</u>FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)</p>	<p>Vk-hz2 (SEQ ID NO: 10; CDR подчеркнуты)</p>
<p>VL-CDR1</p>	<p>KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7)</p>	<p>Аминокислоты 24-34 SEQ ID NO: 10</p>
<p>VL-CDR2</p>	<p>SASYRYT (SEQ ID NO: 8)</p>	<p>Аминокислоты 50-56 SEQ ID NO: 10</p>
<p>VL-CDR3</p>	<p>QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9)</p>	<p>Аминокислоты 89-97 SEQ ID NO: 10</p>
<p>LC_Y12XX-hz28</p>	<p>DIQMTQSPSFLSASVGDRTITC<u>KASQDVSTAVA</u>WYQQK PGKAPKLLIY<u>SASYRYT</u>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC<u>QQHYSTPWT</u>FGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11)</p>	<p>CDR подчеркнуты; CL = аминокислоты 108-214 (выделены курсивом)</p>

Согласно конкретному варианту осуществления антитело к CD40 по настоящему изобретению содержит CDR гуманизированного антитела Y12XX-hz40 (Vh-hz12;Vk-hz3). Аминокислотные последовательности Y12XX-hz40 представлены в таблице 3.

Таблица 3
Последовательности Y12XX-hz40 (Vh-hz12; Vk-hz3)

Вариабельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT SYWMH WVRQ APGQGLEWMG QINPSQGRSQYNEKFKT RVITITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGLQPFAY WGQGLTIVTVSS (SEQ ID NO: 13)	Vh-hz12 (SEQ ID NO: 13; CDR подчеркнуты)
VH-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	Аминокислоты 31-35 SEQ ID NO: 13
VH-CDR2	QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12)	Аминокислоты 50-66 SEQ ID NO: 13
VH-CDR3	WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3)	Аминокислоты 99-106 SEQ ID NO: 13
HC_Y12XX-hz40-P238K – IgG1a с C-концевым	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT SYWMH WVRQ APGQGLEWMG QINPSQGRSQYNEKFKT RVITITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGLQPFAY WGQGLTIVTVSS <i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</i>	CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1-
лизином и без него	<i>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT</i> <i>QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEL</i> <i>LGGS</i> KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV <i>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</i> <i>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL</i> <i>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</i> <i>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH</i> <i>EALHNHYTQKLSLSLSPG</i> (SEQ ID NO: 14)	P238K = аминокислоты 216-446; P238K подчеркнута; без C-концевого лизина
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT SYWMH WVRQ APGQGLEWMG QINPSQGRSQYNEKFKT RVITITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGLQPFAY WGQGLTIVTVSS <i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV</i> <i>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT</i> <i>QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPEL</i> <i>LGGS</i> KSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV <i>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</i> <i>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL</i> <i>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</i> <i>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH</i> <i>EALHNHYTQKLSLSLSPGK</i> (SEQ ID NO: 15)	CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1-P238K = аминокислоты 216-447; P238K подчеркнута; C-концевой лизин присутствует
Вариабельная область легкой цепи	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC KASQDVSTAVA WYQQK PGQAPRLLIY SASYRYT GIPARFSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYC QQHYSTPWT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	Vk-hz3 (SEQ ID NO: 16; CDR подчеркнуты)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7)	Аминокислоты 24-34 SEQ ID NO: 16
VL-CDR2	SASYRYT (SEQ ID NO: 8)	Аминокислоты 50-56 SEQ ID NO: 16
VL-CDR3	QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9)	Аминокислоты 89-97 SEQ ID NO: 16
LC_Y12XX-hz40	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC KASQDVSTAVA WYQQK PGQAPRLLIY SASYRYT GIPARFSGSGTEFTLTISL QSEDFAVYYC QQHYSTPWT FGGGTKVEIKRTVAAPS VFI <i>FPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS</i> <i>GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACE</i> <i>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i> (SEQ ID NO: 17)	CDR подчеркнуты; CL = аминокислоты 108-214 (выделены курсивом)

Согласно конкретному варианту осуществления антитело к CD40 по настоящему изобретению со-

держит CDR гуманизованного антитела Y12XX-hz42 (Vh-hz14; Vk-hz3). Подробности касательно аминокислотных последовательностей Y12XX-hz42 представлены в табл. 4.

Таблица 4
Последовательности Y12XX-hz42 (Vh-hz14; Vk-hz3)

Вариабельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT <u>SYWMH</u> WVRQA PGQGLEWMG <u>QINPTTGRSQYNEKFKT</u> RVITITADKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCAR <u>WGLQPFAY</u> WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 4)	Vh-hz14 (SEQ ID NO: 4; CDR подчеркнуты)
VH-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	Аминокислоты 31-35 SEQ ID NO: 4
VH-CDR2	QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2)	Аминокислоты 50-66 SEQ ID NO: 4
VH-CDR3	WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3)	Аминокислоты 99-106 SEQ ID NO: 4
HC_Y12XX-hz42-P238K – IgG1a с C-концевым лизином и без него	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT <u>SYWMH</u> WVRQA PGQGLEWMG <u>QINPTTGRSQYNEKFKT</u> RVITITADKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCAR <u>WGLQPFAY</u> WGQGLVTVSSAST <i>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</i> <i>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC</i> <i>NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPPELLGGKSV</i> FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO: 5)	CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1-P238K = аминокислоты 216-446; P238K подчеркнута; без C-концевого лизина
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT <u>SYWMH</u> WVRQA PGQGLEWMG <u>QINPTTGRSQYNEKFKT</u> RVITITADKSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCAR <u>WGLQPFAY</u> WGQGLVTVSSAST <i>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS</i> <i>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC</i> <i>NVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTHTCPPCPAPPELLGGKSV</i> FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD	CDR подчеркнуты; CH1 = аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1-P238K = аминокислоты 216-447; P238K подчеркнута; C-

	GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 6)	концевой лизин присутствует
Вариабельная область легкой цепи	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASYRYT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16)	Vk-hz3 (SEQ ID NO: 16; CDR подчеркнуты)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7)	Аминокислоты 24-34 SEQ ID NO: 16
VL-CDR2	SASYRYT (SEQ ID NO: 8)	Аминокислоты 50-56 SEQ ID NO: 16
VL-CDR3	QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9)	Аминокислоты 89-97 SEQ ID NO: 16
LC_Y12XX-hz42	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>SASYRYT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP <i>SDEQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ</i> <i>ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG</i> <i>LSSPVTKSFNRGEC</i> (SEQ ID NO: 17)	CDR подчеркнуты; CL = аминокислоты 108-214 (выделены курсивом)

Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные последовательности CDR1-, CDR2- и CDR3-областей последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей гуманизированного Y12XX-hz28 (см., например, SEQ ID NO: 4 и 10 соответственно, в качестве примера). Моноклональные антитела содержат все 6 CDR (3 для V_H и 3 для V_L), например, SYWMH (SEQ ID NO: 1), QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2) и WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3) в случае CDR 1-3 вариабельной области тяжелой цепи соответственно и KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), SASYRYT (SEQ ID NO: 8) и QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9) в случае CDR 1-3 вариабельной области легкой цепи соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные последовательности CDR1-, CDR2- и CDR3-областей последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей гуманизированного Y12XX-hz40 (см., например, SEQ ID NO: 13 и 16 соответственно, в качестве примера). Моноклональные антитела содержат все 6 CDR (3 для V_H и 3 для V_L), например, SYWMH (SEQ ID NO: 1), QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12) и WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3) в случае CDR 1-3 вариабельной области тяжелой цепи соответственно и KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), SASYRYT (SEQ ID NO: 8) и QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9) в случае CDR 1-3 вариабельной области легкой цепи соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные последовательности CDR1-, CDR2- и CDR3-областей последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей гуманизированного Y12XX-hz42 (см., например, SEQ ID NO: 4 и 16 соответственно, в качестве примера). Моноклональные антитела содержат все 6 CDR (3 для V_H и 3 для V_L), например, SYWMH (SEQ ID NO: 1), QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2) и WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3) в случае CDR 1-3 вариабельной области тяжелой цепи соответственно и KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), SASYRYT (SEQ ID NO: 8) и QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9) в случае CDR 1-3 вариабельной области легкой цепи соответственно.

"Антитело" (Ab) включает без ограничения иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Каждая H-цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (в настоящем документе сокращено как V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (в настоящем документе сокращено как V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один константный домен, C_L. V_H- и V_L-области дополнительно могут быть разделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются

более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

"Антигенсвязывающая часть" Ab (также называемая "антигенсвязывающим фрагментом") или его антигенсвязывающей части относится к одной или нескольким последовательностям Ab (полноразмерного или фрагмента полноразмерного антитела), которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связываемым полным Ab. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают Fab, $F(ab')_2$, scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab', dsFv, $sc(Fv)_2$ и scFv-Fc.

"Гуманизированное" антитело относится к Ab, в котором некоторые, большая часть или все из аминокислот вне CDR-доменов антитела, не являющегося Ab человека, замещены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. Согласно одному варианту осуществления гуманизированной формы Ab, некоторые, большая часть или все из аминокислот вне CDR-доменов были замещены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большая часть или все из аминокислот в пределах одной или нескольких CDR-областей остались неизменными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, при условии, что они не устраняют способность Ab связываться с конкретным антигеном. "Гуманизированное" Ab сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой исходного Ab.

"Химерное антитело" относится к Ab, в котором вариабельные области происходят из одного вида, а константные области происходят из другого вида, как, например, Ab, в котором вариабельные области происходят из Ab мыши, а константные области происходят из Ab человека.

В контексте настоящего документа "специфическое связывание" относится к связыванию антигена антителом с константой диссоциации (K_d) приблизительно 1 мкМ или ниже, как измерено, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Подходящие системы анализа включают систему для осуществления метода поверхностного плазмонного резонанса VIAcore™ (GE Healthcare Life Sciences, Марлборо, Массачусетс) и программное обеспечение для анализа кинетических данных VIAcore™ (например, версии 2.1).

Связывание антител по настоящему изобретению с CD40 оказывает антагонистическое действие в отношении по меньшей мере одного типа активности CD40. "Типы активности CD40" включают без ограничения активацию Т-клеток (например, индукцию пролиферации Т-клеток или секреции цитокинов), активацию макрофагов (например, индукцию выработки активных форм кислорода и оксида азота макрофагом) и активацию В-клеток (например, пролиферацию В-клеток, переключение изотипа антитела или дифференцировку в тучные клетки). Типы активности CD40 могут быть опосредованы взаимодействием с другими молекулами. "Типы активности CD40" включают функциональное взаимодействие между CD40 и следующими молекулами, которые обозначены с помощью их номеров доступа в UniProt, указанных в скобках:

CALR	(P27797);
ERP44	(Q9BS26);
FBL	(P22087);
POLR2H	(P52434);
RFC5	(P40937);
SGK1	(O00141);
SLC30A7	(Q8NEW0);
SLC39A7	(Q92504);
TRAF2	(Q5T1L5);
TRAF3	(Q13114);
TRAF6	(Q9Y4K3);
TXN	(Q5T937);
UGGT1	(Q9NYU2); и
USP15	(Q9Y4E8).

Например, "активность" CD40 включает взаимодействие с TRAF2. Взаимодействие CD40/TRAF2 обеспечивает активацию NF-κB и JNK. См. Davies et al., Mol. Cell Biol. 25: 9806-19 (2005). Такая активность CD40, следовательно, может быть определена по CD40-зависимой клеточной активации NF-κB и JNK по сравнению с эталоном.

В контексте настоящего документа термины "активировать", "активирует" и "активированный" относятся к повышению данной измеряемой активности CD40 по меньшей мере на 10% по сравнению с эталоном, например, по меньшей мере на 10, 25, 50, 75 или даже 100% или больше. Активность CD40 "подвергнута антагонистическому действию", если активность CD40 снижается по меньшей мере на 10%, и, согласно иллюстративному варианту осуществления, по меньшей мере на приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97 или даже 100% (т. е. выявляемая активность отсутствует) по сравнению с та-

ковой при отсутствии антагониста. Например, антитело может оказывать антагонистическое действие в отношении некоторых или всех типов активности CD40, не активируя при этом CD40. Например, антитело может не активировать пролиферацию В-клеток. Антитело может не активировать секрецию цитокинов Т-клетками, где цитокин представляет собой по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α и IFN- γ .

Вариабельные домены могут содержать одну или несколько каркасных областей (FR) с такой же аминокислотной последовательностью, что и у соответствующей каркасной области, кодируемой сегментом гена антитела зародышевой линии человека. Предпочтительные каркасные последовательности для применения в описанных в настоящем документе антителах представляют собой каркасные последовательности, которые являются подобными по структуре каркасным последовательностям, применяемым в описанных в настоящем документе антителах. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно прививать на каркасные области, которые содержат последовательность, идентичную таковой, обнаруживаемой в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно прививать на каркасные области, которые предусматривают до 20 предпочтительно консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в определенных случаях преимущественным является мутирование остатков в пределах каркасных областей с целью сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, заявки на патент США № № 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные Queen et al.).

Иллюстративные каркасные области включают без ограничения таковые в табл. 5 и 6 ниже.

Таблица 5

Каркасная область тяжелой цепи	Последовательность
FR1	Аминокислотные остатки 1-30 любой VH-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 53-75) или таблице 10 (SEQ ID NO: 4, 13 и 99-113) в Примерах
FR2	Аминокислотные остатки 36-49 любой VH-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 53-75) или таблице 10 (SEQ ID NO: 4, 13 и 99-113) в Примерах
FR3	Аминокислотные остатки 67-98 любой VH-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 53-75) или таблице 10 (SEQ ID NO: 4, 13 и 99-113) в Примерах
FR4	Аминокислотные остатки 107-117 любой VH-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 53-75) или таблице 10 (SEQ ID NO: 4, 13 и 99-113) в Примерах

Таблица 6

Каркасная область легкой цепи	Последовательность
FR1	Аминокислотные остатки 1-23 любой VL-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 76-98) или таблице 10 (SEQ ID NO: 10, 16 и 114-116) в Примерах
FR2	Аминокислотные остатки 35-49 любой VL-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 76-98) или таблице 10 (SEQ ID NO: 10, 16 и 114-116) в Примерах
FR3	Аминокислотные остатки 57-88 любой VL-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 76-98) или таблице 10 (SEQ ID NO: 10, 16 и 114-116) в Примерах
FR4	Аминокислотные остатки 98-107 любой VL-последовательности в таблице 8 (SEQ ID NO: 76-98) или таблице 10 (SEQ ID NO: 10, 16 и 114-116) в Примерах

Вариантный вариабельный домен может отличаться от вариабельного домена последовательности

гуманизированного Y12XX-hz28, Y12XX-hz40 или Y12XX-hz42 на вплоть до 10 аминокислот или на любое целое значение в промежутке, причем вариантный вариабельный домен специфически связывает CD40. В качестве альтернативы, вариантный вариабельный домен может характеризоваться по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей (например, по меньшей мере 92%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей) с последовательностью гуманизированного Y12XX-hz28, Y12XX-hz40, или Y12XX-hz42 соответственно. Неидентичные аминокислотные остатки или аминокислоты, которые отличаются среди двух последовательностей, могут предусматривать аминокислотные замены, добавления или делеции. Остатки, которые отличаются среди двух последовательностей, представляют собой неидентичные положения при выравнивании двух последовательностей с помощью алгоритма выравнивания аминокислотных последовательностей, такого как BLAST® (зарегистрированная торговая марка Национальной медицинской библиотеки США).

Иллюстративные антитела к CD40 по настоящему изобретению могут включать выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с CD40 человека, причем указанное антитело содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем: указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит одно из следующего: (i) CDR1, содержащая SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащая QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), CDR3, содержащая WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3) и (ii) CDR1, содержащая SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащая QINPSQGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 12), CDR3, содержащая WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут оказывать антагонистическое действие в отношении одного или нескольких типов активности CD40. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой химерное антитело. Иллюстративные вариабельные области тяжелых и легких цепей для химерного антитела представлены в табл. 8 Примеров. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой гуманизированное антитело. Иллюстративные гуманизированные вариабельные области тяжелых и легких цепей представлены в табл. 10 Примеров. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать константную область тяжелой цепи человека и константную область легкой цепи человека.

Fc-домен и константная область.

Карбокси-концевая "половина" тяжелой цепи определяет константную область (Fc) и в первую очередь она ответственна за эффекторную функцию. В контексте настоящего документа термин "Fc-домен" относится к последовательностям константной области антитела, содержащим константные домены CH2 и CH3, разграниченные в соответствии с Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th ed., U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991). Fc-область может происходить из IgG человека. К примеру, Fc-область может происходить из Fc-области IgG1 человека или IgG4 человека. Вариабельный домен тяжелой цепи можно сливать с Fc-доменом. Карбоксильный конец вариабельного домена можно соединять или сливать с амино-концом CH2-домена Fc. В качестве альтернативы, карбоксильный конец вариабельного домена можно соединять или сливать с амино-концом линкерной аминокислотной последовательности, которая в свою очередь слита с амино-концом Fc-домена. В качестве альтернативы, карбоксильный конец вариабельного домена можно соединять или сливать с амино-концом CH1-домена, который в свою очередь слит с CH2-доменом Fc. Необязательно белок может содержать шарнирную область после CH1-домена, полностью или частично. Необязательно аминокислотная линкерная последовательность находится между вариабельным доменом и Fc-доменом. Карбоксильный конец вариабельного домена легкой цепи можно соединять или сливать с амино-концом CL-домена.

Иллюстративная последовательность для CH1 тяжелой цепи соответствует аминокислотам 118-215 SEQ ID NO: 5

(ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV; SEQ ID NO: 18).

Иллюстративная последовательность для CL легкой цепи соответствует аминокислотам 108-214 SEQ ID NO: 11

(RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT

HQGLSSPVTKSFNRGEC; SEQ ID NO: 19).

Антитело может представлять собой слитое антитело, содержащее первый вариабельный домен, который специфически связывает CD40 человека, и второй домен, содержащий Fc-домен.

Иллюстративные Fc-домены, применяемые в слитом белке, могут включать домены IgG человека. Иллюстративные Fc-домены IgG человека включают Fc-домен IgG4 и Fc-домен IgG1. Хотя гены тяжелой цепи IgG человека кодируют C-концевой лизин, зачастую такой лизин отсутствует у эндогенных антител

вследствие отщепления в системе кровообращения. Антитела с тяжелыми цепями IgG, включая C-концевой лизин, при экспрессии в культурах клеток млекопитающих также могут характеризоваться различными уровнями присутствия C-концевого лизина (Cai et al., 2011, Biotechnol Bioeng. 108(2): 404-12). Соответственно, C-концевой лизин Fc-домена тяжелой цепи IgG, описанного в настоящем документе, может быть опущен.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен, который содержит аминокислотную последовательность:

ERPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG(P/K)SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW

VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY(N/A)STYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSR(D/E)E(L/M)TKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(K/отсутствует) (Fc-консенсус; SEQ ID NO: 21).

Обозначение в скобках указывает возможную принадлежность аминокислот в данном положении. К примеру, в положении 238 по Kabat может находиться либо пролин (P), либо лизин (K), что обозначено как (P/K). Дополнительные иллюстративные неограничивающие консенсусные последовательности представляют собой SEQ ID NO: 118-120.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина (K), серина (S), аланина (A), аргинина (R) и триптофана (W), и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR. Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются наличием мутации P238 с заменой на лизин в Fc-домене IgG1 человека.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат Fc-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 22-29.

Иллюстративные последовательности, предусматривающие вышеупомянутые Fc-домены IgG1, включают: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий замену аланина в положении 297 по Kabat. Например, выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат Fc-домен, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 32-39.

Описанные в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать (1) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), выбранную из табл. 8 или табл. 10 в примерах, или ее CDR, и/или (2) вариабельную область легкой цепи (V_L), выбранную из табл. 8 или табл. 10 в примерах, или ее CDR.

Раскрытые выделенное в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из Vh-hz12 (SEQ ID NO: 13) и Vh-hz14 (SEQ ID NO: 4).

Раскрытые в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут содержать аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из Vk-hz2 (SEQ ID NO: 10) и Vk-hz3 (SEQ ID NO: 16).

Раскрытые в настоящем документе выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой антитело, выбранное из группы, состоящей из:

- a) Y12XX-hz28-P238K с тяжелой цепью SEQ ID NO: 5 или 6 и легкой цепью SEQ ID NO: 11;
- b) Y12XX-hz40-P238K с тяжелой цепью SEQ ID NO: 14 или 15 и легкой цепью SEQ ID NO: 17; и
- c) Y12XX-hz42-P238K с тяжелой цепью SEQ ID NO: 5 или 6 и легкой цепью SEQ ID NO: 17.

Представлены раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть, где антигенсвязывающая часть выбрана из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, диател и scFv-Fc.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой иммуноконъюгат, причем антитело или его антигенсвязывающая часть соединены с терапевтическим средством.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут представлять собой биспецифическое антитело, причем антитело или его антигенсвязывающая часть соединены со вторым функциональным фрагментом, характеризующимся специфичностью связывания, отличной от таковой указанных антитела или его антигенсвязывающей части.

Раскрытые в настоящем документе антитело или его антигенсвязывающая часть могут также содержать дополнительный фрагмент.

Вариабельные области антител по настоящему изобретению необязательно могут быть соединены с Fc-доменом посредством "аминокислотного линкера" или "линкера". Например, C-конец вариабельного домена тяжелой цепи можно сливать с N-концом аминокислотного линкера, и Fc-домен можно сливать с C-концом линкера. Хотя аминокислотные линкеры могут быть любой длины и состоять из любой комбинации аминокислот, для сокращения взаимодействий между соединенными доменами линкер может быть относительно коротким (например, пять или меньше аминокислот). Аминокислотный состав линкера также может быть скорректирован для сокращения числа аминокислот с крупными боковыми цепями или аминокислот, обуславливающих образование вторичной структуры. Подходящие аминокислотные линкеры включают без ограничения таковые длиной до 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 или 25 аминокислот. Репрезентативные аминокислотные линкерные последовательности включают GGGGS (SEQ ID NO: 40) и линкер, содержащий 2, 3, 4 или 5 копий GGGGS (SEQ ID NO: 41-44 соответственно). В табл. 7 перечислены подходящие линкерные последовательности для применения в соответствии с настоящим раскрытием.

Таблица 7
Репрезентативные линкерные последовательности

GGGGS	SEQ ID NO: 40
(GGGGS) ₂	SEQ ID NO: 41
(GGGGS) ₃	SEQ ID NO: 42
(GGGGS) ₄	SEQ ID NO: 43
(GGGGS) ₅	SEQ ID NO: 44
AST	SEQ ID NO: 45
TVAAPS	SEQ ID NO: 46
TVA	SEQ ID NO: 47
ASTSGPS	SEQ ID NO: 48

Получение антител.

Антитело может быть получено и очищено с применением средних знаний в данной области в подходящей линии клеток-хозяев, являющихся клетками млекопитающих, такой как CHO, 293, COS, NSO и т. п., с последующей очисткой с применением одного или комбинации способов, включая аффинную хроматографию с использованием белка А, метода на основе ионного обмена, методики с обращенной фазой и т. п.

Как хорошо известно в данной области, несколько кодонов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. Таким образом, нуклеиновые кислоты, кодирующие белковую последовательность, включают нуклеиновые кислоты с вырожденными кодонами. Раскрытые в настоящем документе полипептидные последовательности могут кодироваться различными нуклеиновыми кислотами. Генетический код является универсальным и хорошо известным. Нуклеиновые кислоты, кодирующие любую раскрытую в настоящем документе полипептидную последовательность, могут быть легко получены на основе традиционных знаний в данной области, а также могут быть оптимизированы для получения. Хотя возможное количество последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих данный полипептид, велико, учитывая стандартную таблицу генетического кода и пользуясь компьютером специалист в данной области сможет без труда создать любую возможную комбинацию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют данный полипептид.

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи Y12XX Y12XX-hz28, включая константную область CH1 и Fc-домен IgG1-P238K, является следующей:

ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCACAGGTG
 CAGCTGGTGCAGTCTGGTGCCGAGGTCAAAAAGCCAGGCTCCAGCGTGAAGGTGAG
 CTGCAAGGCCTCTGGCTACGCTTTCACCTCTTATTGGATGCACTGGGTGAGACAGGC
 TCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCAGATCAACCCAACCACCGGCAGAAGCC
 AGTACAATGAGAAGTTTAAGACCCGCGTGACCATCACAGCCGACAAGTCCACCAGC
 ACAGCTTATATGGAGCTGTCTTCCCTGAGGTCCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGC
 GCTCGGTGGGGCCTGCAGCCTTTCGCTTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTG
 AGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGC
 ACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
 CCGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC
 GTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGAAAGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC
 CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT
 GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
 AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
 СТАСАСGСAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTGA (SEQ ID NO: 49).

В этой последовательности нуклеотиды 1-51 кодируют сигнальный пептид (необязательный), нуклеотиды 52-402 кодируют варибельную область тяжелой цепи, где нуклеотиды 141-155 кодируют CDR1, нуклеотиды 198-249 кодируют CDR2 и нуклеотиды 346-369 кодируют CDR3 варибельного домена тяжелой цепи Y12XX. Нуклеотиды 403-696 кодируют CH1-домен и нуклеотиды 697-1399 кодируют IgG1-P238K. Нуклеотиды 1400-1402 представляют собой стоп-кодон.

Репрезентативная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельный домен легкой цепи Y12XX Y12XX-hz28, включая константную область CL, является следующей:

ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGCGCGCCTTGGCCGACATC
 CAGATGACCCAGTCCCCCTCCTTCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATC
 ACCTGTAAGGCTTCCCAGGATGTGAGCACAGCCGTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCC
 AGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTATTCGCCTCTTACAGGTATAACGGCGTGCC
 CTCTCGGTTCTCCGGCAGCGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCT
 GCAGCCTGAGGATTTCCGCACCTACTATTGCCAGCAGCACTACTCCACCCCATGGAC
 ATTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT
 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCT
 GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCC
 TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
 TACAGCCTCAGCAGACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT
 CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 50).

В этой последовательности нуклеотиды 1-51 кодируют сигнальный пептид (необязательный), нуклеотиды 52-372 кодируют варибельную область легкой цепи, где нуклеотиды 121-153 кодируют CDR1, нуклеотиды 199-219 кодируют CDR2 и нуклеотиды 316-342 кодируют CDR3. Нуклеотиды 373-693 кодируют CL. Нуклеотиды 694-696 представляют собой стоп-кодон.

Кодирующая последовательность для тяжелой и/или легкой цепи необязательно может кодировать сигнальный пептид, такой как MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 51), на 5'-конце кодирующей последовательности. Как описано выше, иллюстративная нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность такого **сигнального пептида**, представляет собой **ATGAGGGCTTGGATCTTCTTTCTGCTCTGCCTGGCCGGGAGAGCGCTCGCA** (SEQ ID NO: 52).

Соответственно, также предусматривается нуклеиновая кислота, кодирующая раскрытое в настоящем документе анти тело. Такую нуклеиновую кислоту можно вставлять в вектор, такой как подходящий вектор экспрессии, например, pHEN-1 (Hoogenboom et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4133-4137). Дополнительно представлена выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор и/или нуклеиновую кислоту.

Анти тело по настоящему изобретению можно получать и очищать с применением средних знаний в данной области в любой подходящей линии клеток-хозяев, являющихся клетками млекопитающих, такой как CHO (клетки яичника китайского хомячка), 293 (клетки эмбриональной почки человека 293), клетки COS, клетки NSO и т. п., с последующей очисткой с применением одного или комбинации способов, включая аффинную хроматографию с использованием белка А, метода на основе ионного обмена, методики с обращенной фазой и т. п.

Фармацевтические композиции и способы лечения.

Фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или нескольких анти тел и необязательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т. п., а также их комбинации. Фармацевтически приемлемые носители могут также содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающее или эмульгирующее вещества, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность слитого белка. Композиции можно составлять для обеспечения быстрого, замедленного или отсроченного высвобождения активного(ых) ингредиента(ов) после введения. Подходящие фармацевтические композиции и способы их получения известны в данной области. См., например, Remington, *The science and practice of pharmacy*, A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co. (2005).

Фармацевтическую композицию можно вводить отдельно или в рамках комбинированной терапии, (т. е. одновременно или последовательно) с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. Иллюстративным типом средства является молекула мутантного ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4). Иллюстративная молекула мутантного CTLA4 представляет собой L104EA29Y-Ig (белатацепт), которая представляет собой модифицированный CTLA4-Ig. При различных иммунопатологических заболеваниях может потребоваться применение специфических вспомогательных соединений, пригодных для лечения иммунопатологических заболеваний, которые могут определяться индивидуально для каждого пациента. Например, фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими подходящими вспомогательными средствами, например, цитокинами (IL-10 и IL-13, например) или другими иммуностимуляторами, например, хемокинами, опухоль-ассоциированными антигенами и пептидами. Подходящие вспомогательные средства известны в данной области.

Способ лечения иммунопатологического заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, может предусматривать введение пациенту терапевтически эффективного количества анти тела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе. Дополнительно представлен способ лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, который может предусматривать введение пациенту терапевтически эффективного количества анти тела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе. Также представлено применение анти тела или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемой соли для лечения иммунопатологического заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, и/или для лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, которое может предусматривать введение пациенту терапевтически эффективного количества анти тела или его антигенсвязывающей части. Оказание антагонистического действия в отношении CD40-опосредованной активации Т-клеток может обеспечивать ингибирование нежелательных Т-клеточных ответов, возникающих, например, во время аутоиммунных реакций, отторжения трансплантата или аллергических реакций. Ингибирование CD40-опосредованной активации Т-клеток может смягчить прогрессирование и/или тяжесть этих заболеваний.

Также представлено применение анти тела или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемой соли в получении лекарственного препарата для лечения иммунопатологического заболевания и/или для лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении. Лекарственный препарат можно вводить, например, в комбинации с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством.

В контексте настоящего документа "пациент" означает животное, например, млекопитающее, включая человека. У пациента может быть диагностировано иммунопатологическое заболевание. "Лечение", или "лечить", или "осуществление лечения" относится к способу, включающему ослабление прогрессирования или тяжести симптома, нарушения, состояния или заболевания. "Имунопатологическое заболевание" относится к любому заболеванию, ассоциированному с развитием иммунной реакции у индивидуума, включая клеточный и/или гуморальный иммунный ответ. Примеры иммунопатологических заболеваний включают без ограничения воспаление, аллергию, аутоиммунное заболевание или заболевание, связанное с трансплантацией. Таким образом, у пациента может быть диагностировано ауто-

иммунное заболевание или воспалительное заболевание. "Аутоиммунное заболевание" относится к любому заболеванию, ассоциированному с развитием аутоиммунной реакции у индивидуума, включая клеточный и/или гуморальный иммунный ответ. Примером аутоиммунного заболевания является воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая без ограничения язвенный колит и болезнь Крона. Другие аутоиммунные заболевания включают системную красную волчанку, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет, псориаз, склеродермию и атеросклероз. Заболевания, связанные с трансплантацией, включают реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD), острое отторжение трансплантата и хроническое отторжение трансплантата.

Заболевания, которые можно лечить путем введения антитела по настоящему изобретению, могут быть выбраны из группы, состоящей из болезни Аддисона, форм аллергии, анафилаксии, анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, атопической аллергии, аутоиммунных заболеваний органов слуха, аутоиммунных заболеваний органов зрения, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного паротита, бронхиальной астмы, коронарной болезни сердца, болезни Крона, сахарного диабета, эпидидимита, гломерулонефрита, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, воспалительного заболевания кишечника, иммунной реакции на рекомбинантные лекарственные препараты (например, фактор VII у лиц, страдающих гемофилией), волчаночного нефрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, пузырчатки, псориаза, ревматической атаки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, спондилоартропатий, тиреоидита, отторжения трансплантата, васкулита и язвенного колита.

Фармацевтическую композицию можно вводить отдельно или в виде комбинированной терапии, (т. е. одновременно или последовательно) с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. При различных иммунопатологических заболеваниях может потребоваться применение специфических вспомогательных соединений, пригодных для лечения иммунопатологических заболеваний, которые могут определяться индивидуально для каждого пациента. Например, фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими подходящими вспомогательными средствами, например, цитокинами (IL-10 и IL-13, например) или другими иммуностимуляторами, например, хемокинами, опухоль-ассоциированными антигенами и пептидами. Подходящие вспомогательные средства известны в данной области.

Для введения антитела или его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции можно применять любой подходящий способ или путь. Пути введения включают, например, внутривенное, внутривенное, подкожное или внутримышечное введение. Терапевтически эффективная доза вводимого антитела зависит от ряда факторов, включая, например, тип и тяжесть подлежащего лечению иммунопатологического заболевания, применения комбинированной терапии, пути введения антитела или его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции и веса пациента. Неограничивающий диапазон терапевтически эффективного количества однодоменного антитела составляет 0,1-20 миллиграмм/килограмм (мг/кг), и, согласно одному аспекту, 1-10 мг/кг относительно веса тела пациента.

Наборы.

Представлен набор, пригодный для лечения иммунопатологического заболевания у пациента-человека. Представлен набор, пригодный для лечения или предупреждения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания у пациента-человека. Набор может содержать (а) дозу антитела или его антигенсвязывающей части по настоящему изобретению и (b) инструктивный материал по применению антитела или его антигенсвязывающей части в способе лечения иммунопатологического заболевания или по применению антитела или его антигенсвязывающей части в способе лечения или предупреждения аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента.

Термин "инструктивный материал" в контексте настоящего документа включает публикацию, запись, схему или любую другую среду выражения, которую можно применять для сообщения о применимости композиции и/или соединения по настоящему изобретению в наборе. Инструктивный материал набора может, например, быть прикреплен к контейнеру, который содержит соединение и/или композицию по настоящему изобретению или поставляться вместе с контейнером, который содержит соединение и/или композицию. В качестве альтернативы, инструктивный материал может поставляться отдельно от контейнера для того, чтобы пациент применял инструктивный материал и соединение совместно. Доставка инструктивного материала может осуществляться, например, путем физической доставки публикации или другой среды выражения, сообщающей о применимости набора, или, в качестве альтернативы, указанный материал можно получить в электронном виде, например, с помощью компьютера, как, например, по электронной почте или путем загрузки с веб-сайта.

Примеры

Пример 1. Связывание антител мыши к CD40 человека с CD40 человека.

Получали антитела мыши к CD40 человека и тестировали их на предмет связывания с CD40 человека с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Последовательности Vh и Vk для каждого антитела показаны в табл. 8.

Таблица 8

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела мыши к CD40 человека

ID	VH-последовательность	VL-последовательность
	ADX_Y1060.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1060.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1060.ZZ0-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGY TFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPD SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNG VCSYFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 53)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG IYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQANIFPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 76)
	ADX_Y1072.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1072.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1072.ZZ0-1	QVQFQQSGAELARPGASVKLSCKASGY TFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPG DGDSRYNQKFKGKALLTADKSSSIAYM QLNSLASEDSAVYFCARFSLYDGYPPY FDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 54)	DVVMQTPLSLPVSLGDAQISCRSSQS LVHRNGNTYLHWYLVKPGQSPKLLIYRV SNRFGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGIYFCSQSTHFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 77)
	ADX_Y1234.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1234.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1234.ZZ0-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF AFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYINSG VGNTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYL QMSSLKSEDTAMYYCARHGNYAWFAYW GQGLVTVSA (SEQ ID NO: 55)	DILLTQSPAILSVPGERVVFSCRASQS IGTSHHWYQRTIGSPRLLIKYASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLINSVEEDIA DYCQQINSWPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 78)
	ADX_Y1236.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1236.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1236.ZZ0-1	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGF TFSSFGMHWVRQAPEKLEWVAYISSG SSTIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFL QMTSLRSEDAMYYCARYGNAMDYWG QGTSVTVSS	DIVMTQSQKFMSTSVGDRISITCKASQN VRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHT GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADA TYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 79)

	(SEQ ID NO: 56)	
	ADX_Y1238.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1238.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1238.ZZ0-1	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGY AFTNYLIEWVKQRPQGLEWIGVINPG SGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSDSAVYFCARSQLGRRFDYW GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 57)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VRTGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRNT GVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSPPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 80)
	ADX_Y1241.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1241.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1241.ZZ0-1	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGY TFTNYIIQWVKQPGQLEWIGYINPY SSETNYNEKFKGKATLTSKSSSTAYM ELSSLTSEDSAIYFCARDLIGNYWGQG TTLTVSS (SEQ ID NO: 58)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA DYFCQQYSSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)
	ADX_Y1242.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1242.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1242.ZZ0-1	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGY SFTSYVMHWVKQKPGQALEWIGYINPS NDGSEYNERFKGKATLTSKSSSTAYM ELSSLTSEDSAVYYCARWAPYPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 59)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 82)
	ADX_Y1249.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1249.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1249.ZZ0-1	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGY TFTSYTMHWVKQRPQGLEWIGYIDPS SHYTNYNQKFKGTATLTADKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARDYRYAYWYFD VWGAGTTLTVSS (SEQ ID NO: 60)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 83)
	ADX_Y1256.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1256.ZZ0-1-Vk
ADX_Y1256.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGY AFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGYINPT TGYSAYNQKFKDKATLTADKSSSTAYL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFFGGGKLEIK

	QLTSLTSEDSAVYFCSRWGLPPFAYWG QGLTVTVSA (SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 84)
	ADX_Y1257.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1257.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 57.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGY AFTSYWMHWKQRPGQGLEWIGYINPT TGYSAYNQKFKAKTTLTADKSSSTAYM QLTSLTFEDSAVYFCSRWGLPPFAYWG QGLTVTVSA (SEQ ID NO: 62)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 85)
	ADX_Y1258.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1258.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 58.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGY AFTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGFINPT TGyseYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLNSLTSEDSAVYFCARWGLPPFAYWG QGLTVTVSA (SEQ ID NO: 63)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 86)
	ADX_Y1259.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1259.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 59.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSGY SFTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGFINPT TGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLSEDSAVYYCSRWGLPPFAYWG QGLTVTVSA (SEQ ID NO: 64)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 87)
	ADX_Y1260.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1260.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 60.ZZ0-1	QVQLQQSGAELTKPGASVKMSCKASGY SFTSYWMHWKQRPGQGLEWIGSINPS TGYTEDNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARWGLPPFAYWG QGLTVTVSA (SEQ ID NO: 65)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 88)
	ADX_Y1261.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1261.ZZ0-1-Vk

ADX_Y12 61.ZZ0-1	QVQLQQSGAERAKPGASVKMSCKASGY SFTSYWMHWIKQRPGGLEWIGFINPN TGHTDYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCSRWGLPPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 66)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 89)
	ADX_Y1262.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1262.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 62.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGY AFTSYWMHWVKQRPGGLEWIGYINPT TGYSAYNQKFKDKATLTADKSSSTAYM QLNSLTSEDSAVYYCARWDRPPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 67)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGYGTDFFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 90)
	ADX_Y1263.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1263.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 63.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGTSVKMSCKASGY SFTSYWVHWKERPGGLEWIGHTNPN TGYTEYNQKFKDKATLTVDRSSSTAYM QLNSLTSEDSAVYYCARWDRPPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 68)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 91)
	ADX_Y1264.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1264.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 64.ZZ0-1	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCRASGY SFSSYWMHWVKQRPGGLEWIGSINPG NSDAFYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYM ELSSLTNEEDSAVYYCTRWGLPPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 69)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCHQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 92)
	ADX_Y1265.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1265.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 65.ZZ0-1	EVQLQQSGTVLAGPGASVKMSCKASGY SFTSYWMHWVKQRPGQDLEWIGTINPG KGDSNYNQKFKGKAKLTAVTSASTAYM ELSSLTNEEDSAVYYCTRWGLPPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 70)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 93)

	ADX_Y1266.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1266.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 66.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCKASGY SFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQINPS NGRTQYNEKFKSMATLTVDKSSSTAYI QLSSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 71)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTTISVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGKLEIK (SEQ ID NO: 94)
	ADX_Y1267.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1267.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 67.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCEASGY SFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQINPS NGRTQYNEKFKSMATLTVDKSSSTAYI QLNSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 72)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTTISVQAEDLA VYYCLQHYSTPWTFGGKLEIK (SEQ ID NO: 95)
	ADX_Y1268.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1268.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 68.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCKASGY AFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQINPS NGRSQYNEKFKTMTLTVDKSSSTAYI QLSSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAYWG QGTLVTVSA (SEQ ID NO: 73)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTTISVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGKLEIK (SEQ ID NO: 96)
	ADX_Y1269.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1269.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 69.ZZ0-1	QVQLQQSGAELPRPGASVKMSCKASGY TFTDYTVHWVKQRPGQGLEWIGYINPS SSYTSYDQKFKDKATVTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARRTMYWYFDIW GAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 74)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQD VSPNVAWYQQKPGQSPKLLIYSTSYRYT GVPDRFTGSRSGTDFFTTISVQAEDLA IYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 97)
	ADX_Y1297.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1297.ZZ0-1-Vk
ADX_Y12 97.ZZ0-1	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGY TFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPS DSYTNYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARETYYYGSRFP YWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 75)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQN VRINVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS GVPDRFTGSGSGTDFTLTI TNVQSEDLA EYFCQQYNTYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 98)

Данные по кинетике и аффинности в отношении CD40 для связывания мономера CD40 человека с антителами мыши к CD40 человека, захваченного на поверхности сенсорного чипа с белком А, оценивали с помощью SPR. Данные показаны в табл. 9. Показанные данные относятся к одной концентрации CD40 в качестве анализируемого вещества (1 мкМ) и, следовательно, представлены как кажущиеся (app) значения.

Таблица 9
SPR-данные по кинетике и аффинности

Антитело	$k_{a,app}$ (1/Мс)	$k_{d,app}$ (1/с)	KD_{app} (М)
ADX_Y1072.ZZ0-1	7,7E+04	9,2E-03	1,2E-07
ADX_Y1238.ZZ0-1	5,5E+04	1,2E-04	2,2E-09
ADX_Y1258.ZZ0-1	1,7E+04	1,3E-04	7,9E-09
ADX_Y1260.ZZ0-1	5,2E+04	2,1E-04	4,0E-09
ADX_Y1262.ZZ0-1	3,7E+05	2,5E-03	6,6E-09
ADX_Y1264.ZZ0-1	1,4E+04	2,3E-04	1,7E-08
ADX_Y1267.ZZ0-1	3,7E+05	4,1E-04	1,1E-09
ADX_Y1268.ZZ0-1	3,2E+05	4,6E-04	1,4E-09

Исходя из SPR-данных и данных о последовательности, для гуманизации были отобраны три антитела, ADX_Y1258.ZZ0-1, ADX_Y1262.ZZ0-1 и ADX_Y1268.ZZ0-1.

Пример 2. Гуманизация и отбор гуманизированных вариантов Y12XX.

Предпосылки/процедура гуманизации являются такими, как обсуждается в разделе "II. Сконструированные и модифицированные антитела" в WO 2017004006, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Исходя из результатов этого анализа, для тестирования были отобраны девять (9) гуманизированных Vh-последовательностей (Vh-hz1, Vh-hz2, Vh-hz3, Vh-hz4, Vh-hz5, Vh-hz6, Vh-hz9, Vh-hz10 и Vh-hz11) и три (3) гуманизированные Vk-последовательности (Vk-hz1, Vk-hz2 и Vk-hz3). Кроме того, пять (5) гуманизированных Vh-последовательностей (Vh-hz7, Vh-hz8, Vh-hz12, Vh-hz13 и Vh-hz14) были сконструированы так, чтобы они предусматривали мутации, предназначенные для снижения вероятности возникновения химических реакций. Мутации включают мутации D100Q (Y1262_IGHV1.6908-D100Q) и P101A (Y1262_IGHV1.6908-P101A) для снижения потенциального риска гидролиза в Y1262_IGHV1.6908. Мутации также включают N55Q (Y1268_IGHV1.6908-N55Q), G56A (Y1268_IGHV1.6908-G56A) и двойную мутацию S54T-N55T (Y1268_IGHV1.6908-S54T-N55T) для снижения потенциального риска дезамидирования в Y1268_IGHV1.6908. Двойная мутация S54T-N55T была внесена, опираясь на соответствующие аминокислотные остатки, находящиеся в этих положениях в ADX_Y1262.ZZ0-1-Vh. См. табл. 10.

Последовательности для этих вариантов показаны в табл. 10.

Таблица 10

ID	Варибельный Hz №	SEQ ID NO:	Последовательность
Y1258-Vh	Vh-C1	99	<u>QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGYAFTS</u> <u>YWMHWIKQRPQGQLEWIGFINPTTGyseYNQ</u> KFKDKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YFCARWGLPPFAYWGQGLT LV TVSA
Y1258_IGHV1.6908 -Vh	Vh-hz1	100	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTS</u> <u>YWMHWVRQAPQGQLEWMGFINPTTGyseYNQ</u> KFKD <u>RV</u> TI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARWGLPPFAYWGQGLT LV TVSS
Y1258_IGHV1.6908 _A40R-Vh	Vh-hz2	101	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTS</u> <u>YWMHWVRQRPQGQLEWMGFINPTTGyseYNQ</u> KFKD <u>RV</u> TI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARWGLPPFAYWGQGLT LV TVSS
Y1258_IGHV1.6908 _A40R-M48I-S84N- Vh	Vh-hz3	102	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTS</u> <u>YWMHWVRQRPQGQLEWIGFINPTTGyseYNQ</u> KFKD <u>RV</u> TI TADKSTSTAYMELNSLRSEDTAV YYCARWGLPPFAYWGQGLT LV TVSS
Y1262-Vh	Vh-C2	103	<u>QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGYAFTS</u> <u>YWMHWVKQRPQGQLEWIGYINPTTGYSAYNQ</u> KFKDKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YYCARWDRPPFAYWGQGLT LV TVSA
Y1262_IGHV1.6908 -Vh	Vh-hz4	104	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTS</u> <u>YWMHWVRQAPQGQLEWMGYINPTTGYSAYNQ</u>

			<u>KFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWDRPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1262_IGHV1.6908 _A40R-Vh	Vh-hz5	105	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQRPGQGLEWMGYINPTT</u> GYSAYNQ <u>KFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWDRPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1262_IGHV1.6908 _A40R-M48I-S84N- Vh	Vh-hz6	106	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQRPGQGLEWIGYINPTT</u> GYSAYNQ <u>KFKDKATLTADKSTSTAYMELNSLRSED</u> TAV <u>YYCARWDRPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1262_IGHV1.6908 -D100Q-Vh	Vh-hz7	107	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPTT</u> GYSAYNQ <u>KFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWDRPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1262_IGHV1.6908 -P101A-Vh	Vh-hz8	108	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPTT</u> GYSAYNQ <u>KFKDKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWDARPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1268-Vh	Vh-C3	109	<u>QVQLQQPGAELVKPGASVRLS</u> CASGYAFTS <u>YWMHWVKQRPGQGLEWIGQINPSNGRS</u> QYNE <u>KFKTMATLTVDKSSSTAYIQLSSLT</u> SEDSAV <u>YYCARWGLQPFAYWGQGLTVTVSA</u>
Y1268_IGHV1.6908 -Vh	Vh-hz9	110	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPSNGRS</u> QYNE <u>KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWGLQPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1268_IGHV1.6908 _A40R-Vh	Vh-hz10	111	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQRPGQGLEWMGQINPSNGRS</u> QYNE <u>KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> TAV <u>YYCARWGLQPFAYWGQGLTVTVSS</u>
Y1268_IGHV1.6908 _A40R-M48I-Vh	Vh-hz11	112	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC</u> KASGYAFTS <u>YWMHWVRQRPGQGLEWIGQINPSNGRS</u> QYNE

			KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARWGLQPFAYWGQGLVTVSS
Y1268_IGHV1.6908 -N55Q-Vh	Vh-hz12	13	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYAFTS YWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPSQGRSQYNE KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARWGLQPFAYWGQGLVTVSS
Y1268_IGHV1.6908 -G56A-Vh	Vh-hz13	113	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYAFTS YWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPSNARSQYNE KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARWGLQPFAYWGQGLVTVSS
Y1268_IGHV1.6908 -S54T-N55T-Vh	Vh-hz14	4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYAFTS YWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNE KFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARWGLQPFAYWGQGLVTVSS
Y1258-Vk	Vk-C1	114	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVST AVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDFR TSGSGGTDFFTTISLVQAEDLAVYYCQQHYS TPWTFGGGTKLEIK
Y1262-Vk	Vk-C2	115	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVST AVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDFR TSGSGGTDFFTTISLVQAEDLAVYYCQQHYS TPWTFGGGTKLEIK
Y1258_IGKV1.3301 -Vk	Vk-hz1	116	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCKASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRF SGSGGTDFFTTISLQPEDVATYYCQQHYS TPWTFGGGTKVEIK
Y1258_IGKV1.3902 -Vk	Vk-hz2	10	DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCKASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRF SGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYS TPWTFGGGTKVEIK
Y1258_IGKV3.1501 -Vk	Vk-hz3	16	EIVMTQSPATLSPGERATLSCASQDVST AVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIPARF
			SGSGGTDFFTTISLQSEDFAVYYCQQHYS TPWTFGGGTKVEIK

В табл. 10 представлены последовательности варьируемых доменов тяжелой и легкой цепей, применяемые для конструирования гуманизированных антител, а также химерных антител в качестве контроля, для анализов связывания CD40 с применением метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIAcore™, а также анализа с титрованием Octet BLI (обсуждается ниже).

Формат Vh-последовательностей соответствовал изотипу IgG1-P238K (CH1-IgG1-P238K; SEQ ID NO: 25). Формат Vk-последовательностей соответствовал полной легкой цепи с общей CL-последовательностью (аминокислоты 108-214 SEQ ID NO: 11). В табл. 11 "Y1258" и "Y1262" относятся к химерным молекулам, содержащим варьируемые области мыши и константные области человека. Различные комбинации гуманизированных HC-конструкций и LC-конструкций, а также химерные молекулы Y1258 и Y1262 экспрессировались в супернатантах объемом 3 миллилитра (мл) для анализа с титрованием и анализа связывания CD40. Семейство молекул в совокупности было идентифицировано с использованием префикса "Y12XX", за которым следует суффикс "hz#", для однозначного определения пар тяжелой цепи/легкой цепи.

Анализ с титрованием осуществляли с применением интерферометрии биослоев (BLI) на приборе Octet RED (Fortebio) путем захвата антител из супернатанта с применением наконечников сенсора с белком А и измерения ответа захвата по калибровочной кривой, полученной с применением образца контрольного антитела. SPR-данные получали с помощью захвата антител на поверхности с белком А и тестирования связывания 500 нМ и 50 нМ инъекций CD40 человека в качестве анализируемого вещества, с применением прибора BIAcore™ T200 (GE Healthcare). Данные по кинетике для двух концентраций hCD40-мономера были аппроксимированы к ленгмюровской модели связывания 1:1 для получения про-

гнозируемых значений по кинетике и аффинности для этих взаимодействий и для сравнения разных молекул.

Данные по титрованию с помощью Octet и связыванию CD40 в BIAcore™ SPR представлены в табл. 11. Помимо тестирования образцов супернатанта ("sup"), с помощью SPR тестировали очищенные химерные антитела Y1258, Y1262 и Y1268, содержащие изотип IgG1f дикого типа человека (ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SEQ ID NO:117), в качестве контролей; они имеют названия "Y1258-hIgG1f", "Y1632-hIgG1f" и "Y1268-hIgG1f" в табл. 11, а Vh- и Vk-цепи обозначены как "Chim-P".

Таблица 11

Данные по титрованию с помощью Octet и связыванию CD40 в BIAcore™ SPR

ID антитела	Vh	Vk	Образец	Титр (мкг/мл)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
Y1258-hIgG1f	Chim-P	Chim-P	Очищенное	n/a	5,8E+04	5,9E-07	1,0E-11
Y1258	Vh-C1	Vk-C1	sup	54,2	5,6E+04	3,8E-06	6,7E-11
Y12XX-hz1	Vh-hz1	Vk-hz1	sup	3,8	1,5E+04	1,6E-05	1,1E-09
Y12XX-hz15	Vh-hz1	Vk-hz2	sup	34,6	1,6E+04	1,3E-04	8,0E-09
Y12XX-hz29	Vh-hz1	Vk-hz3	sup	56,7	3,7E+04	2,6E-06	6,9E-11
Y12XX-hz2	Vh-hz2	Vk-hz1	sup	4,5	1,7E+04	7,1E-05	4,1E-09
Y12XX-hz16	Vh-hz2	Vk-hz2	sup	58,6	2,0E+05	6,4E-04	3,2E-09
Y12XX-hz30	Vh-hz2	Vk-hz3	sup	82,6	4,1E+04	7,3E-07	1,8E-11
Y12XX-hz3	Vh-hz3	Vk-hz1	sup	6,4	1,5E+04	6,7E-05	4,5E-09
Y12XX-hz17	Vh-hz3	Vk-hz2	sup	50,7	3,7E+05	7,7E-02	2,1E-07
Y12XX-hz31	Vh-hz3	Vk-hz3	sup	93,9	4,1E+04	2,9E-07	7,0E-12
Y1262-hIgG1f	Chim-P	Chim-P	Очищенное	n/a	4,8E+05	5,5E-03	1,2E-08
Y1262	Chim	Chim	sup	92,2	3,5E+05	2,8E-03	8,0E-09
Y12XX-hz4	Vh-hz4	Vk-hz1	sup	4,7	4,6E+05	2,2E-03	4,7E-09
Y12XX-hz18	Vh-hz4	Vk-hz2	sup	73,6	3,5E+05	2,4E-03	7,1E-09
Y12XX-hz32	Vh-hz4	Vk-hz3	sup	104,3	2,9E+05	3,0E-03	1,0E-08
Y12XX-hz5	Vh-hz5	Vk-hz1	sup	4,5	3,5E+05	2,5E-03	7,2E-09
Y12XX-hz19	Vh-hz5	Vk-hz2	sup	56,7	3,8E+05	2,3E-03	6,2E-09
Y12XX-hz33	Vh-hz5	Vk-hz3	sup	85,5	2,9E+05	3,3E-03	1,1E-08
Y12XX-hz6	Vh-hz6	Vk-hz1	sup	6,7	3,8E+05	2,4E-03	6,4E-09
Y12XX-hz20	Vh-hz6	Vk-hz2	sup	50,3	3,1E+05	2,5E-03	8,2E-09
Y12XX-hz34	Vh-hz6	Vk-hz3	sup	93,7	3,7E+05	2,8E-03	7,6E-09
Y12XX-hz8	Vh-hz8	Vk-hz1	sup	11,2	7,2E+05	1,5E-01	2,1E-07
Y12XX-hz22	Vh-hz8	Vk-hz2	sup	49,1	3,7E+05	7,9E-02	2,1E-07

Y12XX-hz36	Vh-hz8	Vk-hz3	sup	136,7	3,9E+05	1,0E-01	2,5E-07
Y1268-hlgG1f	Chim-P	Chim-P	Очищенное	n/a	4,0E+05	1,3E-03	3,2E-09
Y12XX-hz9	Vh-hz9	Vk-hz1	sup	5,1	2,0E+05	8,9E-04	4,6E-09
Y12XX-hz23	Vh-hz9	Vk-hz2	sup	59,4	2,0E+05	6,4E-04	3,2E-09
Y12XX-hz37	Vh-hz9	Vk-hz3	sup	138,4	2,6E+05	8,4E-04	3,3E-09
Y12XX-hz10	Vh-hz10	Vk-hz1	sup	8,6	2,0E+05	7,3E-04	3,6E-09
Y12XX-hz24	Vh-hz10	Vk-hz2	sup	48,1	1,9E+05	8,2E-04	4,4E-09
Y12XX-hz38	Vh-hz10	Vk-hz3	sup	185,5	2,5E+05	8,8E-04	3,6E-09
Y12XX-hz11	Vh-hz11	Vk-hz1	sup	7,5	1,8E+05	8,8E-04	5,0E-09
Y12XX-hz25	Vh-hz11	Vk-hz2	sup	55,4	1,9E+05	6,4E-04	3,4E-09
Y12XX-hz39	Vh-hz11	Vk-hz3	sup	134,2	2,4E+05	8,4E-04	3,5E-09
Y12XX-hz12	Vh-hz12	Vk-hz1	sup	2,7	1,7E+05	1,4E-03	8,3E-09
Y12XX-hz26	Vh-hz12	Vk-hz2	sup	36,8	1,6E+05	1,2E-03	7,5E-09
Y12XX-hz40	Vh-hz12	Vk-hz3	sup	99,8	2,4E+05	1,1E-03	4,7E-09
Y12XX-hz13	Vh-hz13	Vk-hz1	sup	3,0	2,1E+05	8,3E-04	3,9E-09
Y12XX-hz27	Vh-hz13	Vk-hz2	sup	49,5	1,9E+05	8,8E-04	4,7E-09
Y12XX-hz41	Vh-hz13	Vk-hz3	sup	52,7	2,5E+05	9,4E-04	3,8E-09
Y12XX-hz14	Vh-hz14	Vk-hz1	sup	5,0	1,7E+05	8,3E-04	5,0E-09
Y12XX-hz28	Vh-hz14	Vk-hz2	sup	70,1	1,8E+05	6,2E-04	3,5E-09
Y12XX-hz42	Vh-hz14	Vk-hz3	sup	100,0	2,4E+05	8,3E-04	3,5E-09

Для данной конструкции тяжелой цепи, титр обычно является самым высоким при образовании пары с легкими цепями, содержащими Vk-hz3 (SEQ ID NO: 18), более низким для тяжелых цепей, образующих пару с Vk-hz2 (SEQ ID NO: 10) и самым низким для тяжелых цепей, образующих пару с легкими цепями, содержащими Vk-hz1 (SEQ ID NO: 116).

Из данных SPR-анализа видно, что антитела связывались с различной аффинностью с CD40, со значениями KD в диапазоне от более 1 E-07 до менее 1 E-09. В случае этих же антител, аффинность была слишком высокой, чтобы ее можно было точно определить с определенной степенью достоверности в этом анализе, поскольку скорость диссоциации была слишком низкой для измерения. Эти значения, которые в таблице выделены курсивом, выходят за пределы точного количественного определения в данном анализе.

Исходя из последовательностей, титра и SPR-данных по связыванию, антитела были отобраны для экспрессии в более крупном масштабе, очистки и дополнительного определения характеристик. SPR-анализ с применением очищенных антител осуществляли с помощью захвата антител на поверхности с белком А, со связыванием мономера CD40 человека в сериях разведений 500-3,9 нМ (2:1) либо при 25°C, либо при 37°C в буфере PBS-T pH 7,1; данные по титрованию были аппроксимированы к ленгмюровской модели связывания 1:1. Данные представлены в табл. 12.

Таблица 12
SPR-данные по кинетике и аффинности

Лиганд	Образец	25°C			37°C		
		ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)
Y12XX-hz28	hCD40	2,2E+05	6,9E-04	3,1	4,4E+05	3,7E-03	8,5
Y12XX-hz40	hCD40	2,9E+05	1,3E-03	4,4	5,2E+05	5,7E-03	10,9
Y12XX-hz42	hCD40	3,1E+05	7,3E-04	2,3	6,3E+05	3,4E-03	5,5
Антитело В		6,1E+04	2,3E-03	37			

Из этих данных видно, что отобранные антитела Y12XX связывают антиген с высокой аффинностью и значениями KD в диапазоне KD=1 E-9 М при 25°C. Связывание сравнивали с таковым другого антитела к CD40, антитела VI-mAb-B (заявка на выдачу патента США № 9090696, последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 31; в настоящем документе

обозначено как "антитело В" и "BI-LALA"). Как видно из данных в табл. 12, антитело В связывается с CD40 с намного более низкой аффинностью, чем гуманизированные молекулы Y12XX.

Все три гуманизированные версии антитела Y12XX были сильными антагонистами пролиферации В-клеток, стимулируемой тримерным агонистом CD40L-IZ. См. табл. 13.

Таблица 13

Ингибирование пролиферации В-клеток, индуцированной растворимым тримером CD40L

	Среднее (IC50 нг/мл)	Стандартное отклонение (STDEV)	п доноров
Антитело В	9,4	3,9	6
Y12XX-hz28-P238K	6,7	3,6	8
Y12XX-hz40-P238K	6,0	4,7	2
Y12XX-hz42-P238K	12,1	2,3	2

Y12XX-hz28-P238K также было сильным антагонистом пролиферации В-клеток, стимулируемой клеточным CD40L из CD40L-экспрессирующих клеток CHO. См. табл. 14.

Таблица 14

Активность в отношении ингибирования стимуляции CD40L-экспрессирующими клетками CHO пролиферации В-клеток

	Активность (IC50 в нг/мл % ингибирования)	Стандартное отклонение	п доноров
Антитело В	62% *	25%	6
Y12XX-hz28-P238K	38,1	9,8	8

* % ингибирования при наивысшей тестируемой дозе (1-3 мкг/мл)

Данные для гуманизированных антител Y12XX сравнивали с таковыми для антитела В, для которого было показано сильное ингибирование пролиферации В-клеток, обусловленное сигналами растворимого CD40L, но которое было намного менее эффективным в отношении ингибирования пролиферации В-клеток, обусловленной клеточным CD40L (клетки CHO, сверхэкспрессирующие CD40L). В отличие от этого, для гуманизированных антител Y12XX наблюдали только <10-кратный сдвиг в активности в отношении ингибирования стимуляции CD40L клеточной поверхности, обеспечивая более надежное блокирование В-клеточных ответов на CD40L.

Формат гуманизированных антител Y12XX соответствовал изотипу IgG1-P238K (CH1-IgG1-P238K; SEQ ID NO: 25) для снижения аффинности связывания в отношении FcγR и снижения FcγR-опосредованной передачи сигнала. FcγR-связывание для репрезентативного гуманизированного антитела Y12XX с таким изотипом IgG1-P238K (Y12XX-hz28-IgG1-P238K) сравнивали со связыванием контрольного антитела, соответствующего изотипу IgG1 дикого типа (контрольное IgG1), а также антитела В, которое соответствует изотипу IgG1, с мутациями L234A-L235A. Эти мутации L234A-L235A также вводили для снижения FcγR-связывания.

SPR-исследования FcγR-связывания осуществляли с помощью захвата антител на поверхности сенсорного чипа с белком А и связывания очищенных His-меченных FcγR человека в качестве анализируемого вещества. Связывание hCD64 предусматривало титрование 10 мкМ - 1,5 нМ hCD64 (серии разведения 2:1), тогда как данные для низкоаффинных FcγR hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 и hCD16a-F158 предусматривали титрование 10 мкМ - 13,7 нМ белка FcγR.

Для контрольного IgG1-антитела было продемонстрировано связывание со всеми из тестируемых FcγR. См. фиг. 1А. По сравнению с диким типом, для антитела Y12XX-hz28-IgG1-P238K продемонстрировано в 125 раз более слабое связывание с hCD64, и не продемонстрировано выявляемое связывание с какими-либо из низкоаффинных тестируемых FcγR hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 и hCD16a-F158. См. фиг. 1В. Для антитела В также продемонстрировано более слабое связывание

hCD64, по сравнению с IgG1 дикого типа, но также продемонстрировано существенное связывание с hCD16a-V158 (KD=7 мкМ) и некоторое слабое связывание с hCD32a-H131 и hCD32a-R131. См. фиг. 1С. Значения KD представлены на фиг. 1D.

Гуманизированные версии антитела Y12XX с мутацией P238K в Fc-области дополнительно тестировали на предмет какой-либо агонистической активности. Происходящие из моноцитов незрелые дендритные клетки (iDC) являются очень чувствительными к CD40-активации, при этом при CD40-стимуляции происходит повышение выработки цитокинов (IL-6) и повышаются уровни экспрессии поверхностных маркеров активации (CD86 и CD54). Следовательно, наиболее перспективные гуманизированные антитела Y12XX тестировали, чтобы оценить их способность стимулировать iDC. Способность антител к CD40 оказывать агонистическое действие в отношении CD40 можно повысить путем кластеризации или перекрестного связывания Fc-частей молекулы с FcγR поверхности клетки. Добавление клеток CHO, сверхэкспрессирующих CD32a, низкоаффинный FcγR, применяли для оценки потенциала к FcγR-опосредованной кластеризации/перекрестному связыванию. В этих экспериментах соотношение клеток CHO и iDC составляло 1:6, что соответствует потенциально увеличенному уровню кластеризации/перекрестного связывания. BMS-986090 и 2141 применяли в качестве положительных контролей. BMS-986090 представляет собой антагонистическое однодоменное антитело к CD40, слитое с Fc IgG4 (см. SEQ ID NO: 1287 в WO 2012/145673). 2141 (mAb 134-2141) представляет собой частичный агонист CD40 (см. Robert Vonderheide et al., 2007, J. Clin. Oncol. 25(7): 876-883). L6-IgG4 представляет собой слитый белок без CD40-связывающей способности, и оно служило в качестве отрицательного контроля.

Как видно из данных на фиг. 2, добавление либо частичного агониста 2141, либо BMS-986090 приводило лишь к слабой активации iDC в подгруппе доноров. Однако добавление CD32a-экспрессирующих клеток CHO либо к 2141, либо к BMS-986090 приводило к устойчивому повышению выработки IL-6 (фиг. 2B) и повышению уровня экспрессии CD86 и CD54 (фиг. 2B и фиг. 2C соответственно) почти у каждого тестируемого донора, наряду с FcγR-опосредованной кластеризацией этих молекул посредством их Fc-частей, что приводит к активации CD40. В отличие от этого, в случае Y12XX-hz28-P238K и Y12XX-hz40-P238K, отдельно или вместе с CD32-зависимой кластеризацией, не наблюдали вышеупомянутых признаков активации iDC, которые наблюдали для отрицательного контроля с применением iDC-клеток от 6-10 доноров. Y12XX-hz42-P238K тестировали в клетках от 4 доноров, и для них наблюдали признаки слабой активации, включая выработку IL-6 и повышение уровня экспрессии CD86 и CD54 только у одного из четырех доноров, что, в отличие от активности, наблюдаемой для 2141 или BMS-986090, не зависело от добавления CD32a-экспрессирующих клеток CHO.

Материалы и способы для примеров 1 и 2.

SPR FcγR-связывания.

FcγR-связывание можно измерять *in vitro* с применением очищенных FcγR с применением таких способов, как метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIAcore™. В одном из способов тестируют связывание очищенных His-меченных белков FcγR (FcγR-his) с антителами, которые захватывают на поверхности сенсора, содержащей белок А, который был иммобилизован с применением стандартных химических реакций с этил(диметиламинопропил)карбодимидом (EDC)/N-гидроксисукцинимидом (NHS), с блокированием этаноламином. Такие эксперименты осуществляют на приборе BIAcore™ T200 (GE Healthcare, Марлборо, Массачусетс) при 25°C. Например, образцы очищенного антитела в концентрации 3 мкг/мл сперва захватывают на поверхности с иммобилизованным белком А с применением времени контакта 15 секунд (с) при скорости потока 10 мкл/мин. После этого обеспечивают связывание очищенных белков FcγR-His при различных концентрациях, как, например, в диапазоне от 10 мкМ до 1,5 нМ (серии разведения 2:1) или от 10 мкМ до 13,7 нМ (серии разведения 2:1) с применением промежутка времени ассоциации и диссоциации 120 с при скорости потока 30 мкл/мин. Все стадии осуществляют в подвижном буфере, состоящем из 10 mM NaPO₄, 130 mM NaCl, 0,05% p20 (PBS-T), pH 7,1. Тестируемые белки FcγR в этих исследованиях включают "высокоаффинный" FcγR CD64 (hFcγRI), а также "низкоаффинные" FcγR CD32a-H131 (FcγRIIa-H131), CD32a-R131 (FcγRIIa-R131), CD32b (FcγRIIb), CD16a-V158 (FcγRIIIa-V158) и CD16a-F158 (FcγRIIIa-F158), которые были экспрессированы и очищены в собственной лаборатории. SPR-данные были аппроксимированы к ленгмюровской модели связывания 1:1 или к равновесной модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для анализа данных BIAcore™ T200 для получения значений константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и константы диссоциации (K_D).

С целью сравнения ответов в виде связывания для разных FcγR, SPR-данные можно анализировать путем расчета максимального ответа в виде связывания как процентную долю теоретического максимального ответа в виде связывания (%R_{max}), с применением уравнения:

Уравнение 1.

$$\%R_{\max} = (\text{ответ в виде связывания анализируемого вещества}) / [((M_w \text{ анализируемого вещества}) / (M_w \text{ лиганда})) \times (\text{ответ лиганда}) \times (\text{стехиометрия анализируемое вещество:лиганд})],$$

где "анализируемое вещество" представляет собой FcγR, а "лиганд" представляет собой захваченное антитело. В этом анализе не принимается во внимание масса антитела или FcγR с учетом гликозилирова-

ния и предполагается 100% фракционная активность захваченного лиганда. Поскольку Fc γ R гликозилированы, значения %R_{max}, как правило, превышают 100% в условиях насыщения.

Кинетика и аффинность связывания CD40.

Аффинность одновалентного связывания CD40 молекулами антител измеряют с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore™ T200 (GE Healthcare Life Sciences) при 25°C или 37°C путем захвата антитела на поверхности сенсорного чипа с иммобилизованным белком А, а затем связывания мономерного белка CD40 человека (полученного в собственной лаборатории) с применением, например, времени ассоциации 180 с и времени диссоциации 180 с или 360 с при 30 мкл/мин в PBS-T, pH 7,1. SPR-данные были аппроксимированы к ленгмюровской модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для анализа данных BIAcore™ T200 для получения значений константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и константы диссоциации (K_D).

Анализ с титрованием.

Анализ с титрованием осуществляли с применением интерферометрии биослоев (BLI) на приборе Octet® RED (ForteBio, Фремонт, Калифорния) при 25°C. Антитела захватывали из супернатанта с применением наконечников сенсора с белком А с применением времени ассоциации 120 с и измеряли ответ в виде связывания и сравнивали его с данными калибровочной кривой, полученной с применением образца контрольного антитела, с целью определения концентрации антитела в супернатанте.

Выделение и культура первичных клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из гепаринизированной крови человека с помощью разделения в градиенте плотности Ficoll. Моноциты выделяли из PBMC согласно протоколу Manual EasySep™ (STEMCELL, Ванкувер, Канада). Один миллион выделенных моноцитов высевали в каждую лунку 6-луночного планшета в 6 мл полной среды (RPMI-1640, 10% термоинактивированная фетальная телячья сыворотка, 100 единиц/мл пенициллина-стрептомицина), содержащей IL-4 (100 нг/мл) и GM-CSF (100 нг/мл), и инкубировали в течение 6 суток при 37°C/5% CO₂, меняя среду каждые сутки и замещая ее свежей средой, содержащей ту же концентрацию цитокинов. iDC (незрелые дендритные клетки) собирали на 6-е сутки, тщательно промывали и ресуспендировали в полной среде.

Обработка iDC антителами к CD40 в присутствии или в отсутствие кластеризации/перекрестного связывания Fc γ R. Титрования различных биологических средств выполняли в полной среде и добавляли их в 96-луночные планшеты в двух повторах. В случае перекрестного связывания, к клеткам на 30 мин добавляли антитела перед добавлением CD32a-экспрессирующих клеток CHO в соотношении 1:6. Клетки инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение примерно 18-20 ч, из каждой лунки отбирали 150 мкл супернатанта, разбавляли 1:5 и оценивали в отношении концентраций белка IL-6, TNF α и IL-12 с применением коммерчески доступных наборов для ELISA (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки, оставшиеся в планшетах после сбора супернатантов, объединяли в 1 образец на обработку в двух повторах и переносили в новый 96-луночный планшет с круглодонными лунками (RB) и помещали на 4°C. Клетки промывали D-PBS, не содержащим Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺, и окрашивали в течение 30 мин на льду для оценки жизнеспособности клеток с применением набора LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Клетки промывали и ресуспендировали в D-PBS, не содержащим Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺, 2% FBS, 0,1% NaN₃ (буфер для окрашивания) и осуществляли блокирование с использованием 5 мкл/лунку Human TruStain FcX™ (раствор для блокирования Fc-рецепторов, Biolegend, Сан-Диего, Калифорния) в буфере для окрашивания.

DC подвергали иммунологическому окрашиванию с использованием:

PerCpCy5.5-конъюгированных α CD3, α CD19, α CD14 (Lin⁻), BVU395-конъюгированных α CD11c (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния), APC-конъюгированных α CD86 (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния), PE-конъюгированных α CD83 (eBioscience, Сан-Диего, Калифорния), FITC-конъюгированных α CD54 (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния), и инкубировали их при 4°C в течение 45 мин. Клетки два раза промывали в буфере для окрашивания и фиксировали (15 при RT, с защитой от света) путем добавления 100 мкл буфера для фиксации BD Cytfix (BD Bioscience, Сан-Диего, Калифорния). DC оценивали в отношении экспрессии CD86, ICAM-1 и CD83 с применением проточного цитометра LSRII-Fortessa (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния) и программного обеспечения для анализа FlowJo (Treestar, Ашленд, Орегон).

Ингибирование CD40L-индуцированной пролиферации В-клеток человека. В-клетки миндалин человека получали от педиатрических пациентов в ходе стандартной процедуры удаления миндалин и выделяли их путем измельчения и осторожного растирания ткани, пропускания клеток через сито и выделения мононуклеарных клеток с разделением в градиенте плотности с применением среды для выделения Lympholyte®-H для выделения клеток человека (Cedarlane Labs, Берлингтон, Онтарио). Мононуклеарные клетки собирали с границы раздела фаз, промывали и выполняли метод образования розеток с овечьими эритроцитами (SRBC, Colorado Serum Company; Денвер, Колорадо), оставляя клетки на час при 4°C, с последующим разделением в градиенте плотности с выделением Т-клеток. Клетки снова промывали и ресуспендировали в RPMI, содержащей 10% FBS (полная среда). Титрования антител выполняли в

полной среде и добавляли их в 96-луночный планшет с круглодонными лунками (RB) в трех повторах. Добавляли 1×10^5 В-клеток миндалин человека и стимулировали их либо растворимым IZ-hCD40L (2 мкг/мл), либо клетками яичника китайского хомячка, стабильно трансфицированными CD40L человека (CHO-hCD40L), облученными с использованием дозы 10000 рад, и высевали в каждую лунку при плотности 2×10^3 клеток/лунку в конечном объеме 200 мкл. Планшеты инкубировали при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ в течение 72 ч, метили в течение последних 6 ч $0,5 \text{ мкКи } ^3\text{[H]-тимидина}$ на лунку, собирали и выполняли количественное определение с помощью жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Пролиферацию В-клеток количественно определяли по включению тимидина.

Пример 3. In Vitro анализы Fc-рецепторов.

Антитела могут выполнять эффекторные функции, такие как комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), за счет связывания Fc-области с Fc-гамма рецепторами (Fc γ R) на поверхности иммунных клеток или факторами комплемента. Антителозависимый клеточный фагоцитоз является еще одной потенциальной Fc-эффекторной функцией. Для дополнительного определения характеристик гуманизированных антител Y12XX, антитела анализировали в отношении комплементзависимой цитотоксичности (CDC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В табл. 15 приведены антитела, анализируемые в этом примере.

Таблица 15

	Название	Ссылка
1	BMS-986291 (Y1238-hz1-P238K)	См. WO 2018/217976
2	15B5-hz61-P238K	Антитело к CD40 (полученное в собственной лаборатории)
3	5F11-45-P238K	См. WO 2018/217976
4	Y12XX-hz28-P238K	
5	Y12XX-hz40-P238K	
6	Y12XX-hz42-P238K	
7	Антитело С	Антитело к CD40 (см. Ristov et al. (2018) Am J Transplant. 18(12):2895-2904. Epub 2018 May 24.)
8	BI-LALA	См. заявку на выдачу патента США № 9090696, последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 31; IgG1-изотип, предусматривающий мутации L234A-L235A
9	BMS-986090	Однодоменное антитело к CD40 (слитый полипептид BMS3h-56-269-IgG ₄ Fc); см., например, WO 2012/145673)
10	TT hIgG1	Антитело человека к столбнячному токсину, IgG1-изотип (полученное в собственной лаборатории) (изотипический контроль)
11	CD20 hIgG1	Антитело человека к CD20, IgG2-изотип (полученное в собственной лаборатории) (положительный контроль)

CDC-анализ осуществляли следующим образом.

"Среда для CDC-анализа" относится к среде 1640, разработанной в Мемориальном институте Розуэлл-Парк (RPMI) (HyClone), с L-глутамином, без фенолового красного (HyClone), дополненной 0,1% BSA (Sigma) и 1% пенициллином-стрептомицином (Life Technologies). В лунки 96-луночного планшета для анализа добавляли пятьдесят (50) микролитров целевых клеток (5×10^5 клеток/мл в среде для CDC-

анализа). Целевые клетки представляли собой клетки Raji, которые эндогенно экспрессируют CD40 (полученные от ATCC). Для каждого тестируемого антитела готовили серийные разведения (от 133 до 0,002 нМ) и в каждую лунку добавляли 25 микролитров антитела каждой концентрации. В каждую лунку добавляли двадцать пять микролитров комплемента человека (полученного от Quidel; разведенного 1:3 средой для CDC-анализа). Содержимое планшетов для анализа инкубировали при 37°C в течение 4 ч в инкубаторе с увлажнением. После инкубации в каждую лунку добавляли 100 микролитров CellTiter-Glo® (Promega, Мадисон, Висконсин). Затем получали данные по люминесценции с использованием планшет-ридера PerkinElmer EnVision® (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс). Процент жизнеспособности рассчитывали относительно изотипического контроля (100% живых). Полученные в результате значения откладывали на графике в зависимости от концентрации антитела. График процентной доли жизнеспособности клеток для каждого антитела строили с применением программного обеспечения Prism v5.01 от GraphPad Inc.

CDC-анализ осуществляли два раза.

Во втором анализе применяли свежеразмороженную сыворотку крови человека, содержащую комплемент. Результаты показаны на фиг. 3. На фиг. 3А показана первая итерация анализа, а на фиг. 3В показана вторая итерация анализа. CD20 hIgG1 представляет собой положительный контроль и демонстрирует цитотоксичность. Выявляемую CDC-активность для анализируемых антител к CD40 не наблюдали, и, в частности, ни одно из анализируемых гуманизированных антител Y12XX не индуцировало комплементзависимую цитотоксичность.

ADCP-анализ осуществляли следующим образом.

"Среда для ADCP-анализа" относится к среде RPMI-1640 с L-глутамином, без фенолового красного (HyClone), дополненной 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG (Gibco). Эффекторные клетки представляли собой первичные CD14⁺ моноциты человека, очищенные из свежих PBMC от 2 разных здоровых доноров-людей. Целевые клетки снова представляли собой клетки Raji. Клетки Raji метили 2,0 мкМ RKN26 (красный флуоресцентный краситель; Sigma) и доводили концентрацию до 4×10^6 клеток/мл в среде для ADCP-анализа. Меченые целевые клетки предварительно покрывали антителами путем добавления меченых целевых клеток (50 мкл/лунку) в 96-луночный планшет с лунками с V-образным дном, содержащий 50 мкл/лунку тестируемого или контрольного антитела, и инкубирования в течение 30 мин на льду. Клетки промывали, затем добавляли эффекторные клетки (CD14⁺ моноциты) (100 мкл/лунку), чтобы получить конечное соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) 1:4, и конечную концентрацию антитела в диапазоне от 30 нМ до 0,1 нМ. Затем планшет помещали в инкубатор с увлажнением при 37°C на 1 ч. Клетки окрашивали меченым APC антителом к CD89 (BioLegend) в течение 30 мин на льду и анализировали с помощью проточного цитометра (BD Canto™, BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). Клетки гейтировали в отношении CD89⁺ клеток, а затем в отношении окрашенных фагоцитированных эффекторов (CD89⁺, RKN26⁺). Процентную долю фагоцитоза рассчитывали как популяцию CD89⁺, RKN26⁺ клеток в общей популяции CD89⁺ клеток. Фоновое значение для изотипического контроля вычитали с получением конечной процентной доли фагоцитоза. Данные анализировали с применением программного обеспечения FlowJo и программного обеспечения Prism v5.01 от GraphPad Inc.

Иллюстративные данные с применением CD14⁺ моноцитов от двух разных доноров показаны на фиг. 4. CD20 hIgG1 являлось положительным контролем и индуцировало фагоцитоз клеток Raji, как и ожидалось. BMS-986090 также индуцировал фагоцитоз. В отличие от этого, ни одно из других тестируемых антител, включая гуманизированные антитела Y12XX к CD40 по настоящему изобретению, не индуцировало выявляемый фагоцитоз в этом анализе.

ADCC-анализ осуществляли следующим образом.

"Среда для ADCC-анализа" относится к RPMI-1640 с L-глутамином, без фенолового красного (HyClone), дополненной 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG (Gibco) и 1 мМ пируватом натрия (Life Technologies). Первичные NK-клетки (естественные клетки-киллеры) человека очищали из свежих PBMC от 2 разных собственных доноров и применяли в качестве эффекторных клеток. PBMC выделяли из образцов гепаринизированной цельной крови путем центрифугирования в градиенте плотности и промывали PBS, дополненным 2% FBS (HyClone). NK-клетки выделяли из пула PBMC с помощью отрицательного отбора с применением набора для разделения на основе магнитных гранул (Miltenyi Biotec). Для активации NK-клеток, очищенные NK-клетки ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде MyeloCult H5100 (StemCell Technologies), дополненной 1 мкМ гидрокортизоном (StemCell Technologies) и 500 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека (Peprotech), и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующие сутки активированные эффекторные NK-клетки два раза промывали в среде для ADCC-анализа и доводили концентрацию до 5×10^5 клеток/мл в среде для ADCC-анализа. Клетки Raji (целевые клетки) метили кальцеином следующим образом. Реагент кальцеин AM (Life Technologies) готовили путем добавления 20 мкл DMSO сверхвысокой чистоты в пробирку для проведения реакций, содержащую 50 мкг лиофилизированного реагента. Восстановленный кальцеин AM в объеме 2 мкл добавляли в суспендированные клетки Raji на каждые 1 мл объема; клетки перемешивали на вортексе и помещали в инкубатор с увлажнением с 37°C на 30 мин. После завершения периода инкубации меченые целе-

вые клетки промывали 3 раза средой для ADCC-анализа и доводили концентрацию до 10 клеток/мл в среде для ADCC-анализа. Меченые целевые клетки (50 мкл/лунку) добавляли в 96-луночный планшет с лунками с V-образным дном, содержащий 50 мкл/лунку тестируемого или контрольного антитела. Затем добавляли активированные эффекторных NK-клетки (100 мкл/лунку), чтобы получить конечное соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) 10:1, и конечную концентрацию антитела в диапазоне от 0,0002 до 1 мкг/мл. Затем планшет помещали в инкубатор с увлажнением при 37°C на 2 часа. Супернатант (50 мкл/лунку) переносили в 96-луночный планшет с лунками с прозрачным дном и высвобождение кальцеина измеряли путем считывания интенсивности флуоресценции с применением планшет-ридера EnVision® (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс), с фильтрами, подобранными на 485 возбуждения и 535 нм испускания.

Целевые клетки, инкубируемые с эффекторными клетками в отсутствие антитела, обеспечивали контроль для фонового антителозависимого лизиса (спонтанный лизис), тогда как целевые клетки, подвергнутые лизису с использованием 20 мкл/лунку 10% Tween-20 в качестве буфера для лизиса, отображали максимальное высвобождение в анализе.

Процентную долю антителозависимого лизиса клеток рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции (MFI) с использованием следующей формулы:

Уравнение 2.

$$\left(\frac{\text{Тестовое MFI} - \text{среднее фоновое}}{\text{Среднее максимальное} - \text{среднее фоновое}} \right) \times 100$$

Процентную долю лизиса целевых клеток наносили на график для каждого антитела с применением программного обеспечения Prism v5.01 от GraphPad Inc.

Иллюстративные данные с применением NK-клеток от двух разных доноров показаны на фиг. 5. Целевые клетки подвергались уничтожению посредством антитела к CD20 в качестве положительного контроля. В отличие от этого, для всех антител к CD40 степень ADCC была низкой или в отношении нее наблюдали отрицательный результат, что указывает на то, что эти антитела не индуцируют антителозависимую цитотоксичность клеток Raji и свидетельствует о наличии антагонизма для этих антител в отношении CD40.

Таким образом, в этом примере потенциал гуманизированных антител Y12XX к CD40 по настоящему изобретению, и, в частности, Y12XX-hz28-P238K, Y12XX-hz40-P238K и Y12XX-hz42-P238K, к опосредованию ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности), ADCP (антителозависимого клеточного фагоцитоза) или CDC (комплементзависимой цитотоксичности) тестировали с применением в качестве мишеней клеток Raji, эндогенно экспрессирующих CD40. Антитело к CD20 применяли в качестве положительного контроля. В случае ADCC, в качестве эффекторных клеток применяли NK-клетки, и два эксперимента проводили с использованием эффекторных клеток от разных доноров. В каждом случае ни одно из Y12XX-hz28-P238K, Y12XX-hz40-P238K и Y12XX-hz42-P238K не индуцировало лизис клеток Raji. Ни одно из Y12XX-hz28-P238K, Y12XX-hz40-P238K и Y12XX-hz42-P238K не индуцировало CDC клеток Raji с показателями, выходящими за пределы эффекта IgG1 человека в качестве изотипического контроля. В случае ADCP, в качестве эффекторных клеток использовали CD14⁺ моноциты, и в этой системе ни одно из Y12XX-hz28-P238K, Y12XX-hz40-P238K и Y12XX-hz42-P238K не стимулировало клеточный фагоцитоз. В отличие от этого, для BMS-986090 наблюдали клеточный фагоцитоз.

Пример 4. Анализ передачи сигнала с участием NF-κB/AP-1.

Целью этого примера было оценить активность NF-κB/AP-1-индуцируемой SEAP (секретируемой щелочной фосфатазы) на клетках Ramos-Blue™ (InvivoGen) в результате стимуляции антителами к CD40.

Клетки Ramos-Blue™ представляют собой репортерную клеточную линию В-лимфоцитов человека, которая экспрессирует NF-κB/AP-1-индуцируемый репортерный ген секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Клеточную линию Ramos-Blue™ применяли для анализа передачи сигнала с участием NF-κB/AP1, а также сигнальных путей с участием Toll-подобных рецепторов (TLR), при этом клетки Ramos-Blue™ эндогенно экспрессируют CD40 и являются чувствительными к CD40 и TLR. При стимуляции клеточные линии Ramos-Blue™ продуцируют SEAP в супернатант культуры клеток. SEAP можно выявлять с применением среды для выявления QUANTI-Blue™ (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния). Уровни SEAP можно отслеживать визуально или с применением спектрофотометра на 620 нм. Клетки Ramos-Blue™ не экспрессируют CD32 (FcγRII).

В табл. 6 приведены тестируемые вещества (антитела и другие полипептиды), анализируемые в этом примере. Все из этих тестируемых веществ получали в собственной лаборатории с помощью BMS.

Таблица 16

Тестируемые вещества	Описание
BMS-986325	Y12XX-hz28-P238K (полностью человеческое mAb изотипа hIgG (P238K) к CD40
BMS-986090	Слитый белок на основе полностью человеческого однодоменного антитела к CD40 и Fc IgG4
mAb 134-2142 (CD40-2142 (hIgG2-Fc))	Полностью человеческое моноклональное антитело к CD40 (агонист)
DT1D12-B16F7-hIgG1.3f mAb	Отрицательный контроль
CD40L-IZ	CD40L-тример человека (h-IZ-hCD40L-тример)

Клетки Ramos-Blue™ были приобретены у InvivoGen. Для этого анализа линию трансдуцированных клеток, обозначенную в настоящем документе как клетки Ramos Blue № 4, получали путем трансдуцирования клеток Ramos-Blue™ CD32 человека (FcγRII). Оба типа клеток Ramos-Blue™ культивировали в среде для культивирования клеток Ramos (среде Дульбекко в модификации Искова (IMDM), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FBS), 2 мМ L-глутамином, пенициллином и стрептомицином (100 Ед/мл, 100 мкг/мл), 100 мкг/мл Normomicin и Zeocin для отбора по чувствительности к лекарственному препарату (100 мкг/мл)). Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂. Оба типа клеток пересевали каждые 3 суток и поддерживали плотность клеток на уровне 0,5×10⁶ клеток/мл. Клетки применяли до пассажа клеток № 21 (P21). После P21 клетки выбрасывали.

Анализ осуществляли следующим образом. "Среда AIM V™" относится к бессывороточной среде, дополненной L-глутамином, 50 мкг/мл стрептомицина сульфатом, 10 мкг/мл гентамицина сульфатом (Thermo Fisher Scientific). Для оценки агонистической активности в отношении CD40 антагонистических антител к CD40 по NF-κB/AP-1-активности в клетках Ramos Blue № 4, клетки два раза (2×) промывали средой AIM V™ без антибиотиков Normocin/Zeoicin. Затем клетки центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин на 2000 об/мин. Среду аккуратно отсасывали, чтобы не задеть клеточный осадок. К клеточному осадку добавляли один (1) мл AIM V™ для ресуспендирования клеточного осадка, и после ресуспендирования добавляли еще 9 мл AIM V™. Клетки подсчитывали с применением счетчика клеток путем добавления 20 микролитров (мкл) окрашивающего раствора ViaStain™ AOPI (акридиновый оранжевый/йодид пропидия) (Nexcelom Bioscience, LLC, Лоренс, Массачусетс) и 20 мкл суспензии клеток Ramos-Blue™.

Концентрацию клеток Ramos-Blue™ доводили до 4×10⁶ клеток/мл в бессывороточной среде AIM V™. Добавляли сто (100) мкл 400К клеток Ramos-Blue™ на лунку в планшет с лунками с плоским дном для тканевых культур. Затем в каждую соответствующую лунку добавляли 100 мкл BMS-986325, BMS-986090, mAb134-2141 (CD40-2142) или контроль. CD40L-IZ применяли в качестве положительного контроля. Клетки Ramos-Blue™ (0,4×10⁶ клеток/лунку) в AIM V™ включали в качестве отрицательного контроля для анализа. Конечный объем составлял 200 мкл/лунку.

Планшеты инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 20 ч. После завершения 20 ч культивирования клеток планшеты центрифугировали в течение 10 мин на 2000 об/мин.

В лунки планшета с лунками с плоским дном добавляли сорок (40) мкл супернатанта культуры клеток из культуры клеток Ramos. Затем добавляли 160 мкл раствора QUANTI-Blue™ на лунку. Конечный объем составлял 200 мкл/лунку.

Планшеты инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 1-6 ч. Уровни SEAP измеряли каждые 60 мин на 620 нм с применением ридера EnVision® (OD: 620 нм).

Иллюстративные данные показаны на фиг. 6. В этом примере моноклональные антитела к CD40 тестировали на клетках Ramos-Blue™, у которых отсутствует CD32, или клетках Ramos-Blue™, трансдуцированных CD32 (Ramos Blue № 4), путем оценки NFκ-В/AP-1-индуцируемой активности SEAP в клетках Ramos-Blue™ при стимуляции с использованием антител к CD40.

В этом анализе добавление CD40-2142 приводило к индукции значимого ответа в виде передачи сигнала (фиг. 6A и 6b). Эти результаты указывают на то, что в такой системе анализа CD40-2142 является полным агонистом. При добавлении BMS-986090 не наблюдали ответа в случае применении клеток Ramos-Blue™ (-CD32) (фиг. 6A), но при этом в анализе с применением клеток Ramos Blue № 4 (клеток Ramos-Blue™, трансдуцированных CD32) (фиг. 6B) наблюдали частичное агонистическое действие. Этот результат указывает на то, что опосредование агонистического ответа, индуцированного добавлением BMS-986090, происходит зависимым от FcγR образом. Контрольный полипептид, тример CD40L-IZ, индуцировал ответ в обоих анализах, что показано на фиг. 6C и 6D.

В отличие от этого, добавление BMS-986325 не приводило к индукции значимого NFκ-B/AP-1-ответа в случае применения либо клеток Ramos-Blue™ (CD32⁻) (фиг. 6A), либо Ramos № 4 (CD32⁺) (фиг. 6B). Эти данные указывают на то, что BMS-986325 не оказывает агонистическое действие в отношении CD40 и не приводит к вовлечению CD32 (FcγRII). Эти данные подтверждают, что сниженная степень вовлечения низкоаффинных FcγR, таких как CD32 (FcγRII), обеспечивает снижение вероятности нежелательной передачи сигнала с участием агонистов и нежелательной потенциальной токсичности.

Пример 7. Сводные данные по фармакокинетическим показателям в доклинической оценке BMS-986325.

Фармакокинетические показатели (PK) BMS-986325 (Y12XX-hz28-P238K) оценивали на мышах и яванских макаках. Поскольку BMS-986325 не реагирует перекрестно с CD40-рецепторами представителей мышинных, PK, оцениваемые у мышей, являются эндогенными или неспецифическими PK. BMS-986325 перекрестно реагирует с CD40-рецепторами обезьян, следовательно, у обезьян оценивали общие PK (специфические и неспецифические PK). После внутривенного (IV) введения мышам BMS-986325 (однократные 1- и 10-мг/кг дозы), для BMS-986325 наблюдали низкий общий сывороточный клиренс "CLT" 0,5-1,02 мл/сутки/кг, ограниченный объем распределения в равновесном состоянии "V_{ss}" 0,12-0,19 л/кг и длительный кажущийся период полувыведения "T-HALF" 118-183 ч (~5-8 суток).

Обезьянам вводили однократную подкожную (SC) дозу BMS-986325.

Вводимая доза представляет собой дозу, при которой специфический клиренс (мишень-опосредованное распределение лекарственного средства "TMDD") не является насыщаемым. После введения однократной SC дозы BMS-986325 хорошо всасывался, с абсолютной биодоступностью 70,4% (относительно показателей экспозиции при такой же IV дозе). После IV-введения обезьянам BMS-986325 (однократная доза 10 мг/кг), для BMS-986325 наблюдали CLT 0,41 мл/сутки/кг, ограниченный V_{ss} 0,05 л/кг и T-HALF 100 ч (~4 суток). Время достижения максимальной концентрации в плазме крови "T_{max}" после введения обезьянам однократной SC дозы BMS-986325 (вводимые дозы 1, 10 и 100 мг/кг) составляло 24-54 ч. Имело место более чем дозопропорциональное повышение экспозиции (максимальная концентрация "C_{max}" и площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированная от нуля до бесконечности "AUC[INF]") и повышение T-HALF по мере увеличения дозы (~31, ~119 и ~197 ч при 1, 10 и 100 мг/кг соответственно). Эти данные свидетельствуют о нелинейной PK и насыщаемом характере клиренса; это, вероятно, является результатом мишень-(CD40)-опосредованного клиренса, отражающего TMDD. В этом исследовании PK с использованием однократной дозы, образование антител к лекарственному средству (ADA) выявляли у ~50% обезьян, однако они не оказали заметного влияния на общие PK-параметры.

Фармакокинетическое/фармакодинамическое моделирование (TMDD-модель с допущением квази-равновесного состояния [TMDD-Qss]) применяли для описания нелинейной PK, наблюдаемой у обезьян, установления взаимосвязи между экспозицией лекарственного средства в сыворотке крови и занятостью рецепторов CD40 (RO) и последующего прогнозирования величины дозы для человека.

Несмотря на то что варианты осуществления настоящего изобретения были описаны в привязке к вышеописанным примерам, следует понимать, что могут быть внесены различные модификации без отступления от сущности таких вариантов осуществления, и они хорошо известны специалистам в данной области.

Эти и другие раскрытые в настоящем документе аспекты, включая иллюстративные конкретные способы лечения, лекарственные препараты и применения, перечисленные в настоящем документе, будут очевидны из изложенных в настоящем документе идей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD40 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем:

указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые специфически связываются с CD40 человека, причем указанное антитело или его антигенсвязывающая часть содержит первую часть полипептида, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую часть полипептида, содержащую вариабельную область легкой цепи, причем:

указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3; и

указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую SEQ ID NO: 8, и CDR3, содержащую SEQ ID NO: 9.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.1, где:
указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, состоящую из SEQ ID NO: 1, CDR2, состоящую из SEQ ID NO: 2, CDR3, состоящую из SEQ ID NO: 3; и
указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, состоящую из SEQ ID NO: 7, CDR2, состоящую из SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из SEQ ID NO: 9.
4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.3, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.3, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.2, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, состоящую из SEQ ID NO: 1, CDR2, состоящую из SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из SEQ ID NO: 3; и
указанная вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, состоящую из SEQ ID NO: 7, CDR2, состоящую из SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из SEQ ID NO: 9.
7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.6, где указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и указанная вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть оказывает антагонистическое действие в отношении CD40.
9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1, 3 или 4, где указанная первая часть полипептида содержит константную область тяжелой цепи человека; и указанная вторая часть полипептида содержит константную область легкой цепи человека.
10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.9, где указанная константная область тяжелой цепи человека представляет собой Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий либо
(1) мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR; либо
(2) замену аланина в положении 297 по Kabat.
11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.10, содержащие Fc-домен IgG1 человека, предусматривающий мутацию в положении 238 по Kabat, которая обуславливает снижение способности связывания с Fc-гамма рецепторами (FcγR), причем пролин 238 (P238) подвергнут мутации с заменой на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и причем антитело или его антигенсвязывающая часть характеризуются сниженной способностью связывания с FcγR.
12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.11, где P238 подвергнут мутации с заменой на лизин.
13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.12, где Fc-домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.
14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.12, где Fc-домен IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.
15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.4, где
первая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, или состоит из нее; и
вторая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, или состоит из нее.
16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по п.4, где
первая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или состоит из нее; и
вторая часть полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, или состоит из нее.
17. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-16, где выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть являются гуманизированными.
18. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-8, где антигенсвязывающая часть представляет собой scFv-Fc.
19. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-17, где антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно соединены с терапевтическим средством.

20. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-17, где антитело или его антигенсвязывающая часть дополнительно соединены со вторым функциональным фрагментом, характеризующимся специфичностью связывания, отличной от таковой указанных антитела или его антигенсвязывающей части.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая:

- а) антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-20; и
- б) фармацевтически приемлемый носитель.

22. Способ лечения или предупреждения CD40-опосредованной иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-20.

23. Способ лечения или предупреждения CD40-опосредованного аутоиммунного или воспалительного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части по любому из пп.1-20.

24. Способ по п.22 или 23, в котором антитело или его антигенсвязывающую часть дополнительно вводят с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством.

25. Способ по п.24, в котором указанное иммунодепрессивное/иммуномодулирующее и/или противовоспалительное средство представляет собой молекулу мутантного CTLA4.

26. Способ по п.25, в котором указанная молекула мутантного CTLA4 представляет собой L104EA29Y-Ig (белатацепт).

27. Способ по п.22 или 23, в котором у субъекта наблюдается заболевание, выбранное из группы, состоящей из: болезни Аддисона, форм аллергии, анафилаксии, анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, atopической аллергии, аутоиммунных заболеваний органов слуха, аутоиммунных заболеваний органов зрения, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного паротита, бронхиальной астмы, коронарной болезни сердца, болезни Крона, сахарного диабета, эпидидимита, гломерулонефрита, диффузного токсического зоба, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, воспалительного заболевания кишечника, иммунной реакции на рекомбинантные лекарственные препараты (например, фактор VII у лиц, страдающих гемофилией), волчаночного нефрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, пузырчатки, псориаза, ревматической атаки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, спондилоартропатий, тиреоидита, отторжения трансплантата, васкулита и язвенного колита.

28. Способ по п.22 или 23, в котором у субъекта наблюдается синдром Шегрена.

29. Способ по п.28, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1, 3, 4 и 9-16.

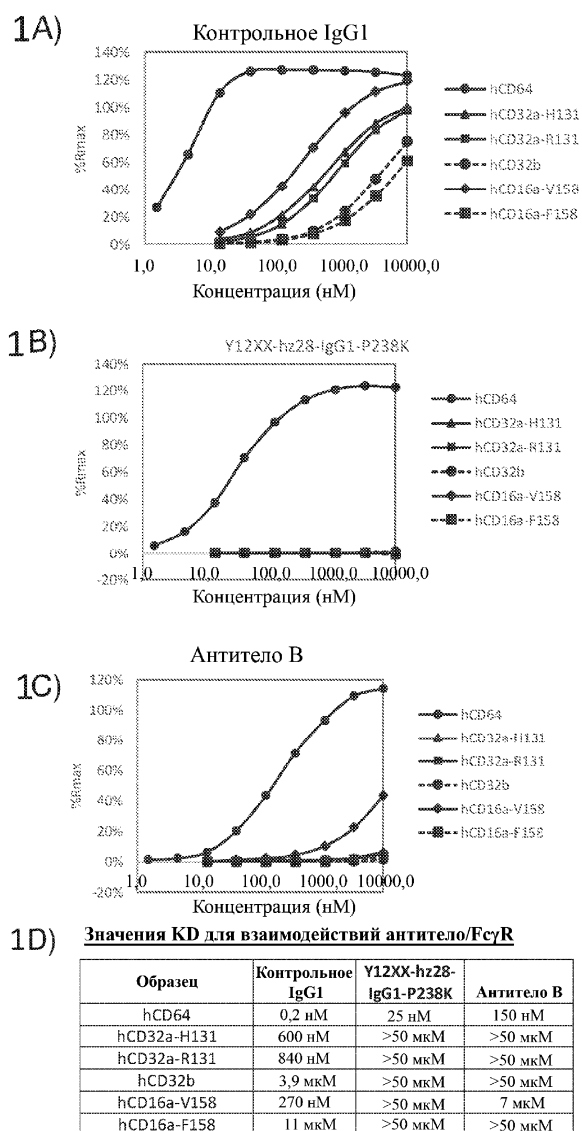
30. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть по любому из пп.1-20.

31. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.30.

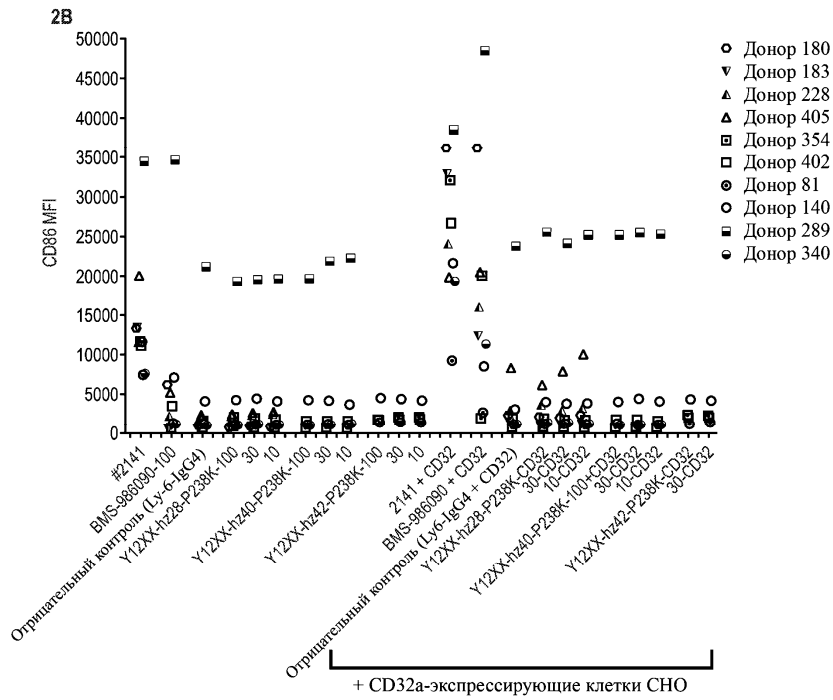
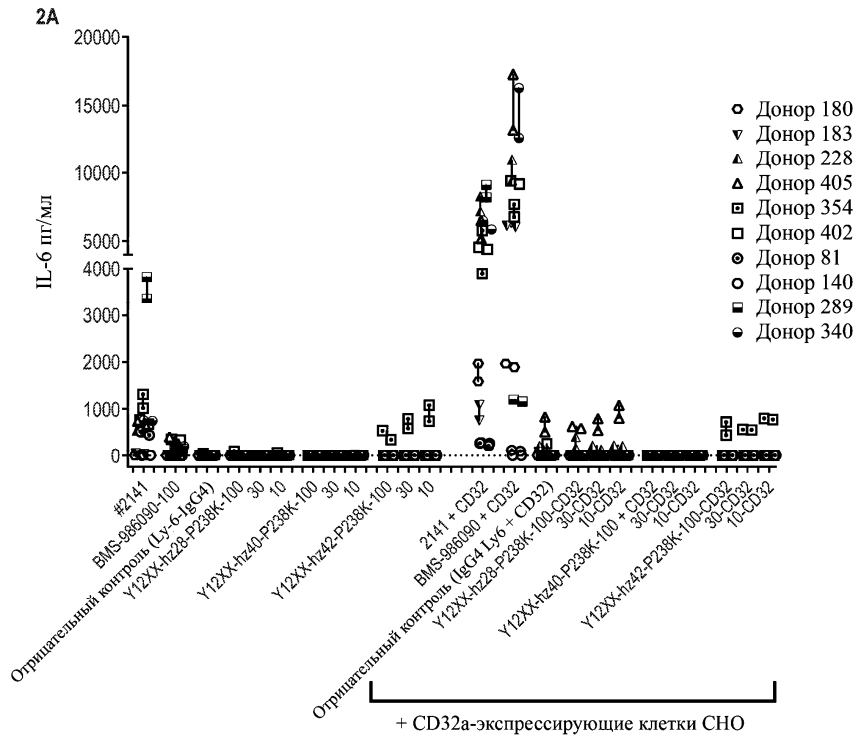
32. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.31 или нуклеиновой кислотой по п.30.

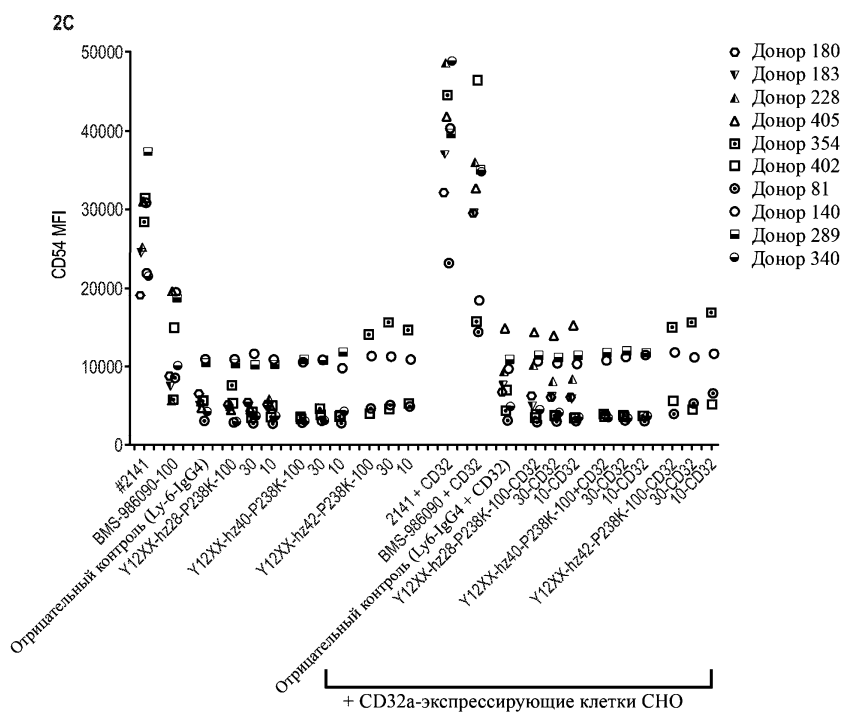
33. Способ получения антитела к CD40 человека или его антигенсвязывающей части, предусматривающий:

- а) обеспечение экспрессии антитела или его антигенсвязывающей части в клетке-хозяине по п.32; и
- б) выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки-хозяина.



Фиг. 1

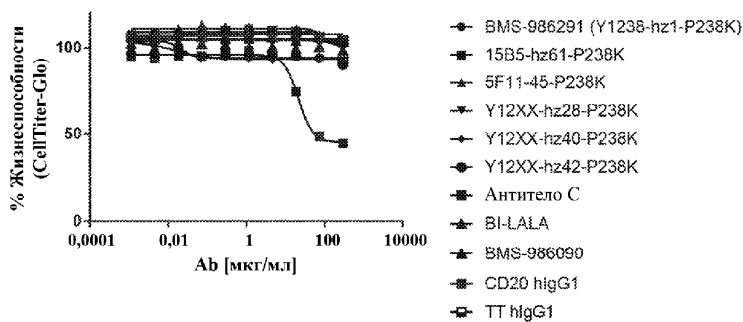




Фиг. 2

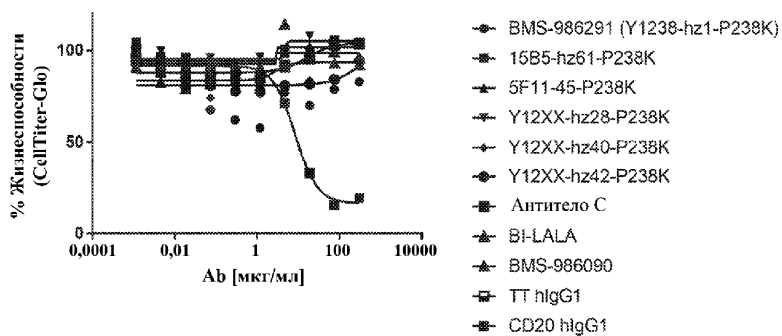
3A

CDC-активность с применением антител к CD40 в отношении целевых Raji



3B

CDC-активность с применением антител к CD40 в отношении целевых Raji



Фиг. 3

4А

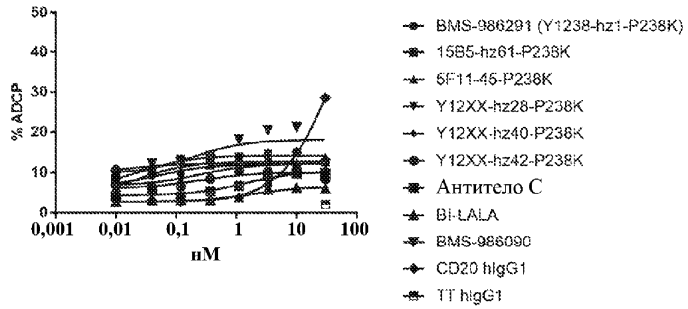
ADCP

Мишень: Raji

Эффектор: CD14+ моноциты В - донор №8

Соотношение Т:Е 4:1

Время инкубации: 4 часа



4В

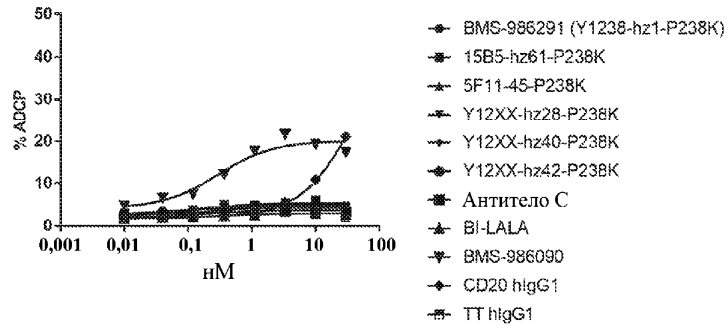
ADCP

Мишень: Raji

Эффектор: CD14+ моноциты В - донор №65

Соотношение Т:Е 4:1

Время инкубации: 4 часа



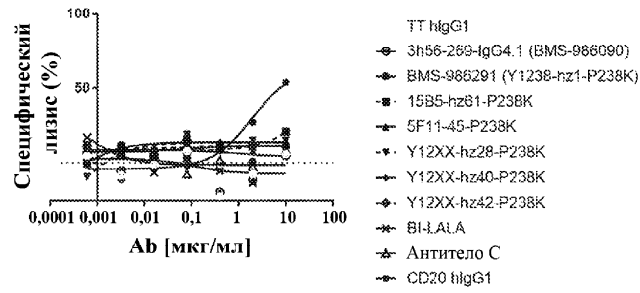
Фиг. 4

5A

ADCC-анализ [10:1]

Эффектор: НК-клетки от донора №38

Мишень: Raji

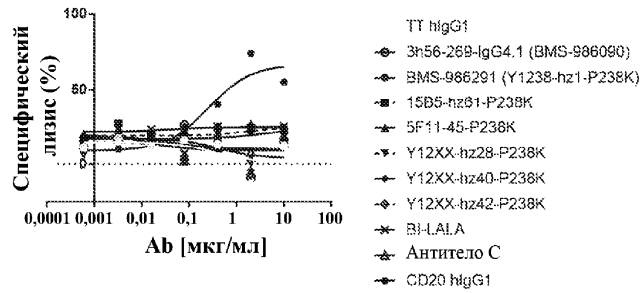


5B

ADCC-анализ [10:1]

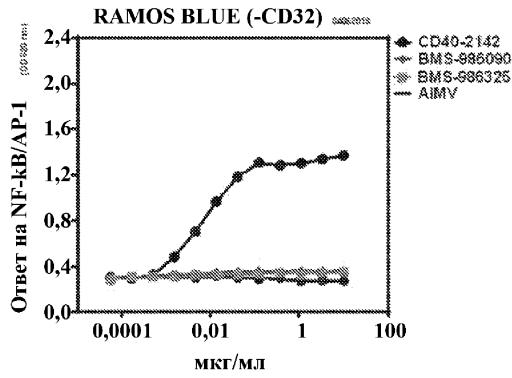
Эффектор: НК-клетки от донора №55

Мишень: Raji

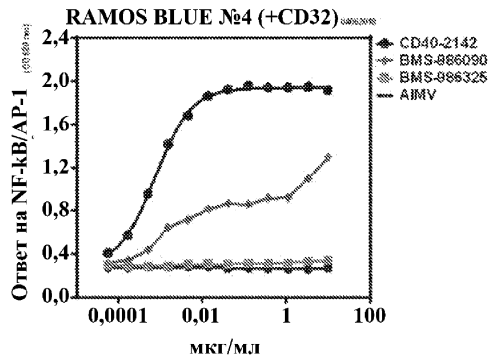


Фиг. 5

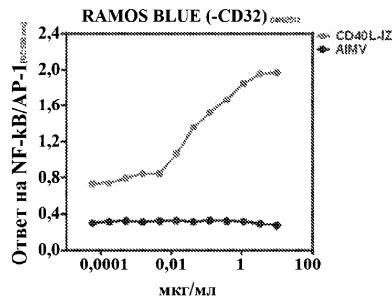
6A



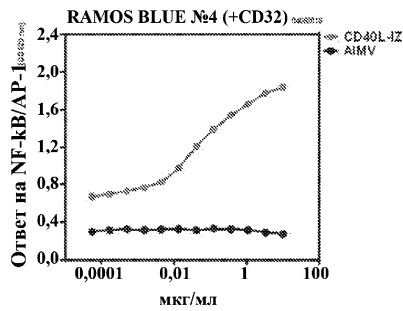
6B



6C



6D



Фиг. 6

