

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393170** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.04.12

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

(22) Дата подачи заявки
2022.06.28

(54) **АНТИТЕЛО К CD40, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И
МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 202110722124.0

(32) 2021.06.28

(33) CN

(86) PCT/CN2022/101780

(87) WO 2023/274201 2023.01.05

(71) Заявитель:

**ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ШЭНДИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД (CN)**

(72) Изобретатель:

**Линь Юань, Су Лу, Линь Кань, Ляо
Чэн (CN)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Предложены антитело к CD40, его антигенсвязывающий фрагмент и его медицинское применение, а также фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, и способ лечения и предотвращения заболевания, в частности способ лечения аутоиммунного заболевания.

A1

202393170

202393170

A1

АНТИТЕЛО К CD40, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ И МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент Китая № 202110722124.0, поданной 28 июня 2021 года.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтики и, в частности, к области лечения или вмешательства в заболевания, связанные с сигнальным путем CD40/CD40L. В частности, настоящее изобретение относится к антителу CD40, его антигенсвязывающему фрагменту и его фармацевтической композиции, а также к способу лечения аутоиммунного заболевания и связанному с ним фармацевтическому применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD40, принадлежащий к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, локализованный на поверхности клеточной мембраны, имеет молекулярную массу около 48 кДа и играет важную роль в иммунной системе. CD40 экспрессируется различными иммунными клетками, такими как В-клетки, дендритные клетки, моноциты и макрофаги, а также тромбоциты, и при определенных условиях может экспрессироваться эозинофилами и паренхиматозными клетками. Природный лиганд для CD40 представляет собой CD154 или CD40L, трансмембранный белок типа II, экспрессия которого может быть индуцирована различными типами клеток, включая активированные CD4⁺ Т-клетки, НК-клетки, тромбоциты и В-клетки (Pucino V et al., 2020).

CD40L при связывании с CD40 рекрутирует TRAF (фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей) и опосредует нисходящую передачу сигналов через пути NF-κB (ядерный фактор «каппа-би»), JNK (с-Jun N-терминальная киназа) и MAPK (митоген-активируемая белковая киназа), что приводит к различным типам активации, зависящие от типа клеток, включая активацию и пролиферацию иммунных клеток, воспалительный фактор и секрецию хемокинов и тому подобное. (Vonderheide RH et al., 2007). Например, передача сигналов через эти пути необходима для нескольких важных

эффекторных функций адаптивной иммунной системы, включая первичные Т-клеточно-зависимые антительные ответы (TDAR), пролиферацию В-клеток, образование зародышевого центра (GC), переключение изотипа иммуноглобулина (Ig), соматическую мутацию и дифференцировку В-клеток памяти и плазматических клеток (Foy TM et al., 1993; Foy TM et al., 1994). В дополнение к воздействию на В-клетки активация пути CD40 обеспечивает важные сигналы для созревания и функционирования DC (дендритных клеток), а также выживания моноцитов, макрофагов и секреции цитокинов (Caux, C et al., 1994).

Нарушение регуляции сигнального пути CD40 может привести к аутоиммунным заболеваниям (Karnell JL et al., 2018). Было обнаружено, что сигнальный путь CD40-CD40L участвует в функции паренхиматозных клеток в воспаленных тканях: активированные эпителиальные клетки из таких участков, как почки, слюнные железы и кожа, которые могут секретировать хемокины, способны реагировать на CD40. Кроме того, уровни экспрессии CD40 или CD40L повышены в местах поражения пациентов с атеросклерозом и в доклинических моделях атеросклероза. CD40 может стимулировать и индуцировать экспрессию ферментов, разрушающих матрикс, способствуя экспрессии тканевых факторов в типах клеток, связанных с патогенезом атеросклероза, таких как эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и макрофаги (Michel NA et al., 2017). Путь CD40 активирует выработку воспалительных факторов, таких как IL-1, IL-6 и IL-8, а также молекул адгезии, включая молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), E-селектин и молекулу адгезии клеток сосудов (VCAM). Взаимодействие CD40/CD40L также использовалось для предотвращения отторжения трансплантата. В исследовании почечных аллотрансплантатов у яванских макаков применение химерного антагониста против-CD40 ch5D12 продемонстрировало, что антагонизм CD40 был достаточным для улучшения состояния и увеличения среднего времени выживаемости до более чем 100 дней. Когда ch5D12 комбинировали с антителом к CD86 и вводили только в начале исследования аллотрансплантата с последующим расширенным лечением циклоспорином, было достигнуто среднее время выживаемости более 4 лет, что позволяет предположить, что такая комбинация может потенциально индуцировать иммунную толерантность (Haanstra et al., 2005).

Многочисленные доклинические исследования свидетельствуют о ключевой роли

взаимодействия CD40/CD40L в стимулировании T-клеточно-зависимых иммунных ответов. Таким образом, блокирование передачи сигналов CD40 считается подходящей и желательной терапевтической стратегией для подавления патогенных аутоиммунных ответов при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и синдром Шегрена. В настоящее время никакие антитела к CD40 не были одобрены в качестве методов лечения таких заболеваний. Таким образом, в данной области техники все еще существует острая потребность в терапевтических агентах, которые могут вмешиваться во взаимодействие CD40-CD40L и блокировать передачу сигналов CD40. Настоящее изобретение относится к терапевтическим гуманизированным антителам к CD40, которые специфически связываются с CD40 и обладают превосходной антигенсвязывающей специфичностью, аффинностью, а также фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, пригодными для вмешательства или лечения заболеваний, связанных с сигнальным путем CD40, в частности аутоиммунных заболеваний. Кроме того, комбинации терапевтических гуманизированных антител к CD40 с такролимусом предложены для лечения заболевания «трансплантат против хозяина» или облегчения отторжения трансплантата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителу к CD40 и его антигенсвязывающему фрагменту, его кодирующему полинуклеотиду, вектору, содержащему полинуклеотид, клетке-хозяину, фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способу их применения для лечения или вмешательства при аутоиммунных заболеваниях (включая болезнь «трансплантат против хозяина» и отторжение трансплантата) и связанному фармацевтическому применению.

Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент

В одном аспекте в некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 и его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи) тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

HCDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

HCDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25;

LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи) легкой цепи, содержащую последовательность $QX_1SEDISSNLX_2$ (SEQ ID NO: 74), где X_1 выбран из группы, состоящей из A и S, и X_2 выбран из группы, состоящей из A и S;

LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность $X_3ASNLAS$ (SEQ ID NO: 75), где X_3 выбран из группы, состоящей из A и P; и

LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность $QGX_4YWX_5X_6X_7SX_8FGX_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 76), где X_4 выбран из группы, состоящей из A и G, X_5 выбран из группы, состоящей из S и T, X_6 выбран из группы, состоящей из S и G, X_7 выбран из группы, состоящей из T и S, X_8 выбран из группы, состоящей из N и Y, X_9 выбран из группы, состоящей из N, S, T и Q, и X_{10} выбран из группы, состоящей из V и G.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 27 и 28, соответственно;

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30; и LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность $QGGYWTSTSNFGX_9X_{10}$ (SEQ ID NO: 73), где X_9 выбран из группы, состоящей из N, S, T и Q, и X_{10} выбран из группы, состоящей из V и G; или

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 29, 27 и 32, соответственно.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30; и LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 69-72.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее любой из вышеупомянутых HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 или любую их комбинацию.

В другом аспекте в некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность SYGVX₁₁ (SEQ ID NO: 88), где X₁₁ выбран из группы, состоящей из S и T;

HCDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность X₁₂IX₁₃SX₁₄GX₁₅X₁₆YYAX₁₇WAX₁₈S (SEQ ID NO: 89), где X₁₂ выбран из группы, состоящей из A и G, X₁₃ выбран из группы, состоящей из G и A, X₁₄ выбран из группы, состоящей из T, S и D, X₁₅ выбран из группы, состоящей из T и S, X₁₆ выбран из группы, состоящей из T и A, X₁₇ выбран из группы, состоящей из S и N, и X₁₈ выбран из группы, состоящей из K и R;

HCDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность GGITX₁₉YAX₂₀ (SEQ ID NO: 90), где X₁₉ выбран из группы, состоящей из A и V, и X₂₀ выбран из группы, состоящей из I и M;

LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO: 91), где X₂₁ выбран из группы, состоящей из Q и E, X₂₂ выбран из группы, состоящей из S и D, X₂₃ выбран из группы, состоящей из S и T, X₂₄ выбран из группы, состоящей из N, Q, S и T, и X₂₅ выбран из группы, состоящей из V и G;

LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; и

LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀ (SEQ ID NO: 92), где X₂₆ выбран из группы, состоящей из F и Y, X₂₇ выбран из группы, состоящей из S, D и N, X₂₈ выбран из группы, состоящей из S и F, X₂₉ выбран из группы, состоящей из

S, T и Y, и X₃₀ выбран из группы, состоящей из V и I.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 33, 34 и 35, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36, 37 и 38, соответственно;

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 42, 37 и 43, соответственно;

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 44 и 35, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 45, 37 и 46, соответственно;

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 41, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36, 37 и 48, соответственно; или

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 49, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность QASQSI_{X₂₄}X₂₅LA (SEQ ID NO: 87), где X₂₄ выбран из группы, состоящей из N, Q, S и T, и X₂₅ выбран из группы, состоящей из V и G; LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; и LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 49, соответственно; LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 83-

86; LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 50 и 48, соответственно.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее любой из вышеупомянутых HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 или любую их комбинацию.

В другом аспекте в некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно; и/или LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 60, 61 и 62, соответственно.

В некоторых конкретных вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее любой из вышеупомянутых HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 или любую их комбинацию.

В другом варианте осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где:

а-1) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 1, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 2;

а-2) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 3, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 4;

а-3) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 5, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 6;

а-4) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в любой из SEQ ID NO: 67 и 68, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в любой из

SEQ ID NO: 63-66;

b-1) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 7, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 8;

b-2) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 9, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 10;

b-3) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 11, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 12;

b-4) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 13, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 14;

b-5) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 15, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 16;

b-6) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 17, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 18;

b-7) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в любой из SEQ ID NO: 81 и 82, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 77-80;

c) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 19, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 20; или

d) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 21, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 22;

где CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, IMGT, Чотиа, АбМ или Contact. В некоторых конкретных вариантах осуществления CDR определяются в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой рекомбинантное антитело.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело кролика, химерное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека или их антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, когда вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело, каркасные области тяжелой цепи получали из IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02, IGHV4-4*08

и IGHJ1*01, и/или каркасные области легкой цепи получали из IGkV1-13*02, IGkV1-9*01, IGkV1-6*01 и IGKJ4*01. Например, каркасные области FR1-FR3 тяжелой цепи получены из IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02 и IGHV4-4*08, и каркасная область FR4 тяжелой цепи получена из IGHJ1*01; каркасные области FR1-FR3 легкой цепи получены из IGkV1-13*02, IGkV1-9*01 и IGkV1-6*01, и каркасная область FR4 легкой цепи получена из IGKJ4*01.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое изобретение антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH и VL, где

A-1) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 2 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-2) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 3 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 4 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-3) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 6 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-4) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 67 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 63-66 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-5) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 68 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 63-66 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-1) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 7 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 8 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-2) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 9 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 10 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-3) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 12 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

В-4) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 13 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 14 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

В-5) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 15 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 16 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

В-6) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 17 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 18 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

В-7) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 81 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 77-80 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

В-8) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 82 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 77-80 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

С) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 19 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 20 или по меньшей мере на 90% идентична ей; или

Д) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 21 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 22 или по меньшей мере на 90% идентична ей.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело IgG или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело IgG1, IgG2, IgG2 или IgG4 или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело IgG1, содержащее мутацию N297A, или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело IgG1, содержащее одно из L234A, L235A, M252Y, S254T и T256E, или любую их комбинацию, или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутый антигенсвязывающий фрагмент антитела к CD40 представляет собой Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, линейное антитело, одноцепочечное антитело, scFv, sdAb, sdFv, нанотело, пептидное антитело, доменное

антитело и мультиспецифическое антитело (биспецифическое антитело, диатело, триатело и тетратело, тандемный ди-scFv, тандемный три-scFv), например, scFv, Fv, Fab или Fab' фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого антигенсвязывающего фрагмента антитела к CD40 полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 93 или 97 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 94 или по меньшей мере на 90% идентична ей; или

полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 95 или 98 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 96 или по меньшей мере на 90% идентична ей.

Как описано выше, «по меньшей мере на 90% идентична» включает, например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% и по меньшей мере на 99% идентична.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента вариабельная область тяжелой цепи имеет от 0 до 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислотных изменений, а вариабельная область легкой цепи имеет от 0 до 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислотных изменений. В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислотные изменения могут представлять собой консервативные замены, замещения или модификации и/или делеции или добавления, которые не влияют на функцию.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается или конкурирует за связывание с тем же эпитопом с вышеупомянутым антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или антигенсвязывающий фрагмент, который блокирует связывание вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента с CD40 (например, CD40 человека).

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или антигенсвязывающий фрагмент, связывание которого с CD40 (например, CD40 человека) блокируется вышеупомянутым антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или антигенсвязывающий фрагмент характеризуется по меньшей мере одним из следующего:

(i) связывание с CD40 человека с K_D , равной (равновесная константа диссоциации) 10 нМ или менее и

ii) отсутствие значительной агонистической активности.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или антигенсвязывающий фрагмент снижает связывание лиганда CD40 с CD40 по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD40 человека с K_D 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления предложена CD40-связывающая молекула, содержащая любое из вышеупомянутых антител к CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, содержащий вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, конъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

Полинуклеотид и Вектор

В настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Выделенный полинуклеотид может представлять собой РНК, ДНК или кДНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой выделенный полинуклеотид.

В настоящем изобретении также предложена молекула ДНК, кодирующая любое из вышеупомянутых антител к CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему

изобретению.

Полинуклеотид, описанный в настоящем документе, может быть в форме, может присутствовать в и/или может быть частью вектора, такого как плазида, космида, YAC (искусственная дрожжевая хромосома) или вирусный вектор. Вектор может, в частности, представлять собой вектор экспрессии, то есть вектор, который может обеспечивать экспрессию VEGF-связывающей молекулы (VEGF - факторы роста эндотелия сосудов) или ее конъюгата *in vitro* и/или *in vivo* (то есть в подходящей клетке-хозяине, организме-хозяине и/или системе экспрессии). Вектор экспрессии обычно содержит по меньшей мере один из полинуклеотидов по настоящему изобретению, который функционально связан с одним или более подходящими регуляторными элементами экспрессии (например, промоторами, энхансерами, терминаторами и т.п.). Выбор элементов и их последовательностей для экспрессии в конкретном хозяине находится в пределах знаний специалистов в данной области техники. Регуляторные элементы и другие элементы, пригодные или необходимые для экспрессии антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, представляют собой, например, промоторы, энхансеры, терминаторы, факторы интеграции, маркеры отбора, лидерные последовательности или репортерные гены.

Полинуклеотид по настоящему изобретению может быть изготовлен или получен известными способами (например, с помощью автоматического синтеза ДНК и/или методов рекомбинантной ДНК) на основе информации об аминокислотной последовательности полипептида по настоящему изобретению и/или может быть выделен из подходящего природного источника.

Клетка-хозяин

Настоящее изобретение предлагает рекомбинантную клетку-хозяина, который экспрессирует антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат по настоящему изобретению, или содержит полинуклеотид или вектор по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку или клетку млекопитающего.

Бактериальные клетки включают, например, клетки грамотрицательных бактериальных штаммов (например, штаммов *Escherichia coli*, штаммов *Proteus* и штаммов *Pseudomonas*) и грамположительных бактериальных штаммов (например, штаммов *Bacillus*,

штаммов *Streptomyces*, штаммов *Staphylococcus* и штаммов *Lactococcus*).

Грибковые клетки включают, например, клетки видов *Trichoderma*, *Neurospora* и *Aspergillus*; или клетки видов *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (например, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (*Pichia pastoris* и *Pichia metanolica*) и *Hansenula*.

Клетки млекопитающих включают, например, клетки HEK293, клетки CHO, клетки ВНК, клетки HeLa, клетки COS и тому подобное.

Однако клетки амфибий, клетки насекомых, растительные клетки и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков, также могут быть использованы в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин, используемая в настоящем изобретении, не может развиваться в полноценную особь растения или животного.

Способ получения

В настоящем изобретении также предложен способ получения антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающий:

- культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и

- сбор из культуры антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, экспрессируемого клеткой-хозяином; и

- необязательно, дополнительную очистку и/или модификацию антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата, включающему конъюгацию или модификацию лекарственного средства на антителе к CD40 или его антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению.

Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть получены внутриклеточно (например, в цитоплазме, в периплазме или в тельцах включения) в клетке, как описано выше, с последующим выделением из клетки-хозяина и необязательно дополнительной очисткой; или они могут быть получены внеклеточно (например, в среде, в которой культивируют клетку-хозяина), с последующим выделением из среды и необязательно дополнительной очисткой. Например, очистку

проводили с использованием колонки Sepharose FF A или G, содержащей отрегулированный буфер для отмывки неспецифически связанных компонентов, а затем связанные антитела элюировали методом градиента pH, детектировали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и собирали. Необязательно, раствор антитела можно фильтровать и концентрировать обычными методами. Растворимые смеси и полимеры также можно удалить обычными методами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученный продукт должен быть немедленно заморожен, например, при -70°C , или лиофилизирован.

Способы и реагенты для рекомбинантной продукции полипептидов, например, конкретные подходящие векторы экспрессии, способы трансформации или трансфекции, метки отбора, способы индукции экспрессии белка, условия культивирования и тому подобное, известны в данной области техники. Аналогичным образом, способы выделения и очистки белка, подходящие для применения в способе получения антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата по настоящему изобретению, хорошо известны специалистам в данной области техники.

Композиция

В настоящем изобретении предложена композиция, содержащая вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически или облегчающе эффективное количество антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

В некоторых конкретных вариантах осуществления единичная доза фармацевтической композиции может содержать от 0,01 до 99 мас.% антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или единичная доза фармацевтической композиции содержит 0,1-2000 мг, а в некоторых конкретных вариантах осуществления 1-1000 мг антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления предложено комбинация или композиция вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента и одного или более дополнительных иммуносупрессивных агентов. Композиция представляет собой, например, фармацевтическую композицию. Необязательно, фармацевтическая композиция

может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, такролимус и фармацевтически приемлемый вспомогательный эксципиент, разбавитель или носитель.

В некоторых вариантах осуществления предложено изделие, содержащее вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Необязательно, изделие содержит контейнер и этикетку. Примерами контейнеров являются бутылки, шприцы и пробирки. Контейнер вмещает композицию, эффективную при лечении состояния. Этикетка на контейнере или связанная с ним указывает на то, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Композиция содержит вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент. Изделие может дополнительно содержать второй контейнер, вмещающий такролимус, который эффективен при лечении состояния.

В некоторых вариантах осуществления предложен продукт, содержащий вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент и такролимус.

Способ лечения и фармацевтическое применение

В настоящем изобретении предложен способ применения вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения, вмешательства, предотвращения или диагностики заболевания или состояния.

В частности, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает применение антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения или облегчения аутоиммунного заболевания или заболевания «трансплантат против хозяина» или облегчения отторжения трансплантата.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела против CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению в комбинации с одним или более дополнительными иммуносупрессивными агентами при получении лекарственного средства для лечения или облегчения аутоиммунного заболевания или заболевания «трансплантат против хозяина»

или облегчения отторжения трансплантата.

В варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить отдельно, последовательно или одновременно с одним или более дополнительными иммуносупрессивными агентами.

В варианте осуществления настоящего изобретения антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить до, после или одновременно с одним или более дополнительными иммуносупрессивными агентами.

В частности, настоящее изобретение предлагает применение антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению в комбинации с такролимусом для получения лекарственного средства для лечения или облегчения аутоиммунного заболевания или заболевания «трансплантат против хозяина» или облегчения отторжения трансплантата. В некоторых вариантах осуществления предложен способ облегчения или лечения заболевания «трансплантат против хозяина» и отторжения трансплантата органа и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту эффективного количества для облегчения или терапевтически эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ облегчения или лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту эффективного количества для облегчения или терапевтически эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения расстройств и заболеваний, связанных с CD40, и соответствующее фармацевтическое применение; в некоторых вариантах осуществления предложен способ ингибирования роста или дифференцировки клеток расстройств, связанных с CD40, и соответствующее фармацевтическое применение; в некоторых вариантах осуществления предложен способ ингибирования роста и/или дифференцировки клеток, экспрессирующих антиген CD40 человека, и соответствующее фармацевтическое применение; в некоторых вариантах

осуществления предложен способ получения антитела, ингибирующего В-клетки у субъекта, и соответствующее фармацевтическое применение; в некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения иммунных расстройств и заболеваний и соответствующее фармацевтическое применение. Все вышеуказанные способы включают введение субъекту или клетке терапевтически или ингибирующе эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ индукции истощения периферических В-клеток и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту эффективного количества для индукции вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или облегчения заболевания или патологического состояния и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, где заболевание или состояние может быть или не быть связано с CD40 и включает: ревматоидный артрит, системную красную волчанку, волчаночный нефрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз и аллергический энцефаломиелит), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, системную красную волчанку, миастению гравис, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, воспалительные заболевания кишечника (например, Болезнь Крона или язвенный колит), анафилаксию, аллергическую реакцию, синдром Шегрена, диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгия, полимиозит, дерматомиозит, воспалительный миозит, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозную анемию, атрофию желудка, хронический гепатит, люпоидный гепатит, атеросклероз, подострую кожную красную волчанку, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гемолитическую анемию, пузырчатку обыкновенную, пузырчатку,

герпетиформный дерматит, очаговую алопецию, пемфигоид, склеродермию, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, болезнь Рейно, эзофагит, склеродактилия и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартериит, системный некротизирующий васкулит, atopический дерматит, atopический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическую лихорадку, астму, повторный аборт, антифосфолипидный синдром, легкое фермера, мультиформную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, легкое любителя птиц, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальную болезнь легких, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, трансфузионную реакцию, артериит Такаюсу, ревматическую полимиалгию, височный артериит, шистосомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзему, лимфоматоидный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойкую возвышающуюся эритема, псориаз, гемолитическую желтуху новорождённых, эозинофильный фасциит, синдром Шулмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохронный циклит, циклит Фукса, IgA-нефропатия, пурпура Шейнелейна-Геноха, реакцию «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, кардиомиопатию, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемию, макроглобулемию Вальденстрема, синдром Эвана, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, остеопороз, гиперчувствительность замедленного типа и аутоиммунную недостаточность гонад. Примерами являются синдром Шегрена, рассеянный склероз и системная красная волчанка.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения заболеваний, связанных с В-лимфоцитами (например, системной красной волчанки, синдрома Гудпасчера, ревматоидного артрита и диабета I типа), Th1-лимфоцитами (например, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, псориаза, синдрома Шегрена, болезни Хашимото, болезни Грейвса, первичного билиарного цирроза, гранулематоза Вегенера, туберкулеза или заболевания «трансплантат против хозяина») или Th2-лимфоцитами

(например, атопического дерматита, системной красной волчанки, атопической астмы, риноконъюнктивита, аллергического ринита, синдрома Оменна, системного склероза или хронического заболевания «трансплантат против хозяина»), и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения опухоли или рака и соответствующее фармацевтическое применение, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, где опухоль или рак могут быть или не быть связаны с экспрессией CD40.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или облегчения заболевания «трансплантат против хозяина» или отторжения трансплантата, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента и такролимуса.

В некоторых вариантах осуществления предложено применение вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента для получения лекарственного средства для лечения или облегчения заболевания «трансплантат против хозяина» или отторжения трансплантата, включая применение в комбинации с такролимусом. В некоторых вариантах осуществления предложено применение такролимуса для получения лекарственного средства для лечения или облегчения заболевания «трансплантат против хозяина» или отторжения трансплантата, включая применение в комбинации с вышеупомянутым антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ применения вышеупомянутого антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с такролимусом для лечения или облегчения заболевания «трансплантат против хозяина» или отторжения трансплантата, и применение в комбинации для получения лекарственного средства для лечения или облегчения заболевания «трансплантат против хозяина» или отторжения трансплантата.

В некоторых вариантах осуществления описанный выше трансплантат представляет собой трансплантат солидного органа, такой как трансплантат почки, трансплантат печени,

трансплантат сердца, трансплантат легкого, трансплантат поджелудочной железы, трансплантат тонкой кишки или композитный тканевой трансплантат.

В некоторых вариантах осуществления описанный выше трансплантат относится к трансплантации, выбранный из группы, состоящей из аллогенной клетки, ксеногенной клетки, аллогенной ткани, ксеногенной ткани, аллогенного органа и ксеногенного органа.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или обращает вспять отторжение тканевого трансплантата акцептором трансплантата, или продлевает или сохраняет функцию ткани, трансплантированной в акцептор трансплантата, или восстанавливает функцию поврежденная ткань трансплантата в акцепторе трансплантата.

Обнаружение

В настоящем изобретении предложена композиция для обнаружения CD40, содержащая антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к способу, системе или устройству для обнаружения CD40 *in vivo* или *in vitro*, причем способ включает обработку образца антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способ, система или устройство для обнаружения *in vitro* могут, например, включать:

(1) приведение образца в контакт с антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом;

(2) обнаружение образования комплекса между антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом и образцом; и/или

(3) приведение эталонного образца (например, контрольного образца) в контакт с антителом; и

(4) определение степени образования комплекса путем сравнения с эталонным образцом. Изменение (например, статистически значимое изменение) образования комплекса в образце или субъекте по сравнению с контрольным образцом или субъектом указывает на наличие CD40 в образце.

В некоторых других вариантах осуществления способ, система или устройство для обнаружения *in vivo* могут включать:

(1) введение субъекту антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(2) обнаружение образования комплекса между антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом и субъектом.

Обнаружение может включать определение места или времени образования комплекса. Антитело к CD40 мечено детектируемым веществом, и метку детектируют для осуществления обнаружения вещества, которое связывается с антителом к CD40 (например, CD40). Подходящие детектируемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Образование комплекса между CD40-связывающим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и CD40 может быть обнаружено путем определения или визуализации антитела, которое связывается или не связывается с CD40. Могут быть использованы обычные анализы обнаружения, такие как иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или иммуногистохимия тканей. Для целей обнаружения антитело к CD40 или его фрагмент по настоящему изобретению могут быть мечены хромофором флуорофором.

В некоторых вариантах осуществления также предложен набор, содержащий антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, который также может содержать инструкции для диагностического применения. Набор также может содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, такой как этикетка или дополнительный диагностический агент. Для применения *in vivo* антитело может быть составлено в фармацевтическую композицию.

Определение терминов

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если иное четко не указано в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Если контекст явно не требует иного, во всем описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и тому подобное должны толковаться во всеобъемлющем смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле; то есть в смысле «включая, но не ограничиваясь этим».

Трехбуквенные и однобуквенные коды для аминокислот, используемые в настоящем описании, раскрыты в *J. biol. chem.*, 243, p3558 (1968).

«CD40» и «антиген CD40» относятся к гликопротеину массой приблизительно 48 кДа, экспрессируемому на поверхности нормальных и неопластических В-клеток, который действует как рецептор для сигналов, участвующих в клеточной пролиферации и дифференцировке (Ledbetter et al., 1987, *J. Immunol.* 138:788-785). Молекула кДНК, кодирующая CD40, была выделена из библиотеки, полученной из клеточной линии лимфомы Беркитта Raji (Stamenkovic et al., 1989, *EMBO J.* 8:1403). Информация о последовательности приведена в таблице 2 настоящего изобретения. Клетка, которая эндогенно экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, характеризующуюся поверхностной экспрессией CD40, включая, но не ограничиваясь ими, нормальные и неопластические В-клетки, интердигитирующие клетки, базальные эпителиальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные клетки, клетки миндалин и плазматические клетки, полученные из костного мозга.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие части), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. Антитело может относиться к иммуноглобулину, структуре тетрапептидной цепи, образованной путем соединения двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей посредством межцепочечных дисульфидных связей. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина отличаются по своему аминокислотному составу и расположению, и, таким образом, по своей антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять классов, или изотипов иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, при этом их соответствующие тяжелые цепи представляют собой μ -цепь, δ -цепь, γ -цепь, α -цепь и ϵ -цепь, соответственно. Ig одного класса может быть разделен на различные подклассы в зависимости от различий в аминокислотном составе шарнирных областей и количества и положения дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть разделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи делятся на κ - или λ -цепи по различиям в константных

областях. Каждый из пяти классов Ig может иметь κ -цепь или λ -цепь. В тяжелых и легких цепях антител последовательности около 110 аминокислот вблизи N-конца значительно варьируются и, таким образом, называются переменными областями (V-области); остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и, таким образом, называются константными областями (C-области). Переменные области включают 3 гиперпеременные области (CDR) и 4 каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями. Три гиперпеременные области определяют специфичность антитела и таким образом также известны как определяющие комплементарность области (CDR). Каждая из переменных областей легкой цепи (VL) и переменных областей тяжелой цепи (VH) состоит из 3 областей CDR и 4 областей FR, расположенных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Три области CDR легкой цепи называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и три области CDR тяжелой цепи называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Для определения или выявления «CDR» детерминированное изображение CDR и идентификация остатков, содержащих антигенсвязывающие сайты антитела, могут быть выполнены путем разделения структуры антитела и/или разделения структуры комплекса антитело-лиганд. Это может быть достигнуто с помощью любого из множества способов, известных специалистам в данной области техники, таких как рентгеновская кристаллография. Для идентификации CDR можно использовать различные методы анализа, включая, но не ограничиваясь, схему нумерации по Кабату, схему нумерации по Чотиа, схему нумерации по AbM, схему нумерации по IMGT, определение по Contact и конформационное определение.

Схема нумерации по Кабату является стандартом для нумерации остатков в антителах и обычно используется для идентификации областей CDR (см., например, Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28:214-8). Схема нумерации по Чотиа аналогична схеме нумерации по Кабату, за исключением того, что она учитывает положение определенных структурных областей петли (см., например, Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196:901-17; Chothia et al., 1989, *Nature*, 342:877-83). Схема нумерации AbM использует набор интеграции компьютерной программы для моделирования структур антител, изготовленный Oxford Molecular Group (см., например, Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci*

(USA), 86: 9268-9272; «AbMTM, A Computer Program for Modelling Variable Regions of Antibodies», Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.). Схема нумерации AbM использует комбинацию информационной базы данных и метода de-novo для моделирования третичной структуры антител из основных последовательностей (см. те, которые описаны в Samudrala et al., 1999, «Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach», *Proteins, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3: 194-198). Определение по Contact основано на анализе доступных сложных кристаллических структур (см., например, MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45). В конформационном определении положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые способствуют энтальпии связывания антигена (см., например, Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156–1166). Кроме того, другие определения границ CDR могут строго не следовать одному из вышеуказанных способов, но все же пересекаться с по меньшей мере частью CDR, определенных по Кабату, хотя они могут быть укорочены или удлинены на основании прогнозов или экспериментальных результатов о том, что конкретный остаток или конкретная группа остатков существенно не влияет на связывание антигена. В данном контексте CDR может относиться к CDR, определенной любым способом, известным в данной области техники, включая комбинации способов. Соответствие между различными схемами нумерации хорошо известно специалистам в данной области техники, и примеры показаны в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Взаимосвязи между схемами нумерации CDR

CDR	по IMGT	по Кабату	по AbM	по Чотиа	по Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Аминокислотные остатки CDR областей VL и VH антитела или

антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению соответствуют известной схеме нумерации по Кабату с точки зрения количества и положений.

Термин «моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть, отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против одной области детерминанты. Кроме того, по сравнению с препаратами поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одиночной детерминанты антигена. Модификатор «моноклональный» указывает на характеристику антитела, полученного из популяции по существу однородных антител, и не должен толковаться как требующий продуцирования антитела каким-либо конкретным способом.

Термин «антитело кролика» в настоящем документе относится к моноклональному антителу, направленному против CD40 человека или его эпитопа, полученному в соответствии со знаниями и навыками в данной области техники. В препарате тестируемому кролику вводили антиген CD40, а затем выделяли антитела, экспрессируемые с желаемыми последовательностями или функциональными свойствами. В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения антитело кролика к CD40 человека или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать константную область легкой цепи κ - или λ -цепи кролика или их варианта или дополнительно содержать константную область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 кролика или их варианта.

Термин «полностью человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Полностью человеческое антитело по настоящему изобретению может включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако термин «полностью человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из

зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, кролика), были привиты в каркасные последовательности человека (т.е. «гуманизированное антитело»).

Термин «гуманизированное антитело», также известное как CDR-привитое антитело, относится к антителу, полученному путем прививки нечеловеческих последовательностей CDR в каркас переменных областей человеческого антитела. Такое антитело может преодолеть сильный иммунный ответ, индуцированный химерным антителом, благодаря переносу большого количества нечеловеческих белковых компонентов. Чтобы избежать снижения активности, вызванного снижением иммуногенности, переменные области полностью человеческого антитела могут быть подвергнуты минимальной обратной мутации для поддержания активности.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, полученному слиянием переменных областей антитела первого вида с константной областью антитела второго вида, которое может снижать иммунный ответ, индуцированный антителом первого вида. В качестве примера, химерное антитело получали сначала обеспечением кроликов, секретирующих кроличье специфическое моноклональное антитело, выделением антитела, затем клонированием гена константной области полностью человеческого антитела как требуется, соединением гена переменной области кролика и гена константной области человека в химерный ген, вставки химерного гена в человеческий вектор и, наконец, экспрессирования молекул химерного антитела в эукариотической промышленной системе или прокариотической промышленной системе. Константная область полностью человеческого антитела может быть выбрана из группы, состоящей из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека или их вариантов, предпочтительно содержащих константные области тяжелой цепи IgG2 или IgG4 человека, или IgG1, мутированного в аминокислотах без ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» включает одноцепочечное антитело (т.е. полноразмерные тяжелую и легкую цепи); Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, однодоменное антитело (например, VH, или VL, или VHH), scFv, бивалентное, или трихвалентное, или четырехвалентное антитело, Bis-scFv, диатело, триатело, триатело, тетратело и эпитоп-связывающий фрагмент любого из вышеперечисленных (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech.

23(9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217). Способы продуцирования и получения таких фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Fab-Fv был впервые раскрыт в WO2009/040562, а его дисульфид-стабилизированная форма Fab-dsFv была впервые раскрыта в WO2010/035012. Антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению также включает фрагменты Fab и Fab', описанные в WO2005/003169, WO2005/003170 и WO2005/003171. Мультивалентные антитела могут иметь множественную специфичность (например, биспецифичность) или могут быть моноспецифическими (см., например, WO92/22583 и WO05/113605), и примером последнего является Tri-Fab (или TFM), описанный в WO92/22583.

Термин «связываться с CD40» относится к способности взаимодействовать с CD40 или его эпитопом, где CD40 или его эпитоп могут быть получены от человека. Термин «антигенсвязывающий сайт» в данном документе относится к прерывистому трехмерному пространственному сайту на антигене, который распознается антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

Термин «антиген» относится к молекуле, используемой для иммунизации иммунокомпетентного позвоночного для получения антитела, которое распознает антиген, или для скрининга библиотеки экспрессии (например, в частности, библиотеки фагов, дрожжей или рибосом). В настоящем документе антиген определен в более широком смысле и включает целевую молекулу, которая специфически распознается антителом, и часть или миметик молекулы, используемой в процессе иммунизации для получения антитела или в скрининге библиотеки для выбора антитела. Для антитела по настоящему изобретению, которое связывается с CD40 человека, мономеры и полимеры (например, димеры, тримеры и т. д.) CD40 человека и усеченные варианты и другие варианты CD40 человека все называются антигенами.

Термин «эпитоп» относится к сайту антигена, с которым связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, примыкающих друг к другу посредством третичной укладки белка. Эпитоп, образованный из смежных аминокислот, как правило, сохраняется после воздействия денатурирующего растворителя, в то время как эпитоп, образованный

посредством третичной укладки, как правило, теряется после обработки денатурирующим растворителем. Эпитоп обычно содержит, например, по меньшей мере от 3 до 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какой эпитоп связан с данным антителом, хорошо известны в данной области техники и включают анализ методом иммуноблоттинга, анализ иммунопреципитации и тому подобное. Способы определения пространственной конформации эпитопа включают методы данной области техники и методы, описанные в данном документе, такие как рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс.

Термин «специфическое связывание» или «селективное связывание» относится к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Как правило, антитело связывается с заданным антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей около менее 10^{-7} М или даже менее, и с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, чем его аффинность отношении связывания с неспецифическим антигеном, отличным от заданного антигена, или его эпитопом (или неспецифические антигены, отличные от близкородственных антигенов, например, BSA и т. д.), при определении с помощью методов поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе с использованием CD40 человека или его эпитопа в качестве анализируемого вещества и антитела в качестве лиганда. Термин «антиген-распознающее антитело» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «специфически связанное антитело».

«Аффинность связывания» или «аффинность» используется в настоящем документе в качестве меры силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами (например, антителом или его частью и антигеном). Аффинность связывания между двумя молекулами может быть количественно определена путем определения константы диссоциации (K_D). K_D может быть определена путем измерения кинетики образования и диссоциации комплекса с использованием, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называются константой скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}), соответственно. K_D связан с k_a и k_d уравнением $K_D = k_d/k_a$. Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно хорошо известными способами и может быть рассчитано способами, такими как описанные Casaci et al (1984, Byte 9: 340-362), даже для сложных смесей.

Например, K_D можно определить с помощью анализа связывания на нитроцеллюлозном фильтре двойной фильтрации, такого как описанный Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432). Другие стандартные анализы для оценки способности связывания антитела с целевым антигеном известны в данной области техники и включают, например, ELISA, вестерн-блоттинг, RIA (радиоиммунологический анализ) и проточную цитометрию, а также другие анализы, приведенные в другом месте настоящего документа. Кинетика связывания и аффинность связывания антитела также могут быть оценены с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), например, с использованием системы BiacoreTM или KinExA. Аффинности связывания, ассоциированные с различными молекулярными взаимодействиями, например, аффинности связывания различных антител с данным антигеном, можно сравнить путем сравнения значений K_D комплексов антитело/антиген. Аналогичным образом, специфичность взаимодействия может быть оценена путем определения и сравнения значения K_D для представляющего интерес взаимодействия (например, специфического взаимодействия между антителом и антигеном) со значением K_D для взаимодействия, не представляющего интерес (например, контрольного антитела, которое известно, как не связывающееся с CD40).

Термин «консервативная замена» относится к замене другим аминокислотным остатком, имеющим свойства, аналогичные исходному аминокислотному остатку. Например, лизин, аргинин и гистидин имеют аналогичные свойства в том, что они имеют основные боковые цепи, а аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота имеют аналогичные свойства в том, что они имеют кислотные боковые цепи. Кроме того, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан имеют аналогичные свойства в том, что они имеют незаряженные полярные боковые цепи, а аланин, валин, лейцин, треонин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин имеют аналогичные свойства в том, что они имеют неполярные боковые цепи. Кроме того, тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин обладают аналогичными свойствами, поскольку они имеют ароматические боковые цепи. Таким образом, специалистам в данной области техники будет очевидно, что даже когда аминокислотный остаток в группе, проявляющей аналогичные свойства, как описано выше, замещен, он не будет проявлять конкретного изменения свойств.

Термины «ингибирование» и «блокирование» используются взаимозаменяемо и охватывают частичное и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование CD40 предпочтительно снижает или изменяет нормальный уровень или тип активности, который имеет место, когда связывание CD40 происходит без ингибирования или блокирования. Ингибирование и блокирование также предназначены для включения любого измеримого снижения аффинности связывания CD40 при контакте с антителом к CD40 по сравнению с CD40, не контактирующим с антителом к CD40.

Предполагается, что термин «ингибирование роста» (например, с участием клеток) включает любое измеримое снижение роста клеток.

«Агонистическая активность», «агонистическая активность» или «агонизм» относится к функции агониста. Связывание агониста с клеточным рецептором инициирует реакцию или активность, аналогичную или идентичную реакции или активности, инициированной природным лигандом рецептора. Например, агонист CD40 может индуцировать любой или все из следующих ответов: клеточную пролиферацию и/или дифференцировку; повышенную регуляцию межклеточной адгезии с помощью таких молекул, как ICAM-1, E-селектин и VCAM; секрецию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и TNF; передачу сигнала через рецептор CD40 такими путями, как TRAF (например, TRAF2 и/или TRAF3), MAP-киназы, такие как NIK (NF- κ B-индуцирующая киназа), I- κ B-киназы (IKK α/β), фактор транскрипции NF- κ B, Ras и путь MEK/ERK, путь PI3K/Akt и путь P38 MAPK; трансдукцию антиапоптотических сигналов такими молекулами, как XIAP, Mcl-1 и BCLx; генерацию В-клеточной памяти и/или Т-клеточной памяти: продуцирование В-клеточных антител; переключение изотипа В-клеток; повышение регуляции клеточной поверхности МНС класса II и CD80/86 и тому подобное. «Антагонистическая активность», «антагонистическая активность» или «антагонизм» относится к функции вещества в качестве антагониста. Например, антагонист CD40 может предотвращать или уменьшать любой из ответов, индуцированных связыванием рецептора CD40 с лигандом агониста, в частности CD40L. Антагонист может снижать любой один или более ответов, индуцированных связыванием с агонистом, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, предпочтительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, более предпочтительно 70%, 80%, 85% и наиболее предпочтительно 90%, 95%, 99% или 100%. Способы измерения специфичности связывания антитела к CD40 и CD40-лиганда и антагонистической

активности известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, стандартные анализы конкурентного связывания, анализы для мониторинга секреции иммуноглобулина В-клетками, анализы пролиферации В-клеток, анализы пролиферации В-клеток, подобные анализу Баншера, анализы Т-клеточных хелперов для продуцирования антител, анализы совместной стимуляции пролиферации В-клеток и анализы для повышения регуляции маркеров активации В-клеток.

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники и могут быть найдены, например, в «Antibodies: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Press (главы 5-8 и 15). Например, кролики могут быть иммунизированы CD40 человека или его фрагментом, и полученные антитела могут быть ренатурированы и очищены, а аминокислотное секвенирование может быть выполнено с помощью обычных способов. Аналогично, антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью общепринятых способов. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, генетически сконструированы таким образом, чтобы содержать одну или более дополнительных областей FR человека в CDR нечеловеческого происхождения. Последовательности зародышевой линии FR человека доступны на веб-сайте ImMunoGeneTics (IMGT).

Антитела могут быть подвергнуты конкурентному скринингу на связывание с одним и тем же эпитопом с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области техники. Например, исследования конкуренции и перекрестной конкуренции могут быть осуществлены для получения антител, которые конкурируют или перекрестно конкурируют друг с другом за связывание с антигеном. Высокопроизводительный способ получения антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом на основе их перекрестной конкуренции, описан в международной патентной публикации № WO03/48731. Следовательно, антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с одним и тем же эпитопом на CD40 с молекулой антитела по настоящему изобретению, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области техники.

Термин «расстройство» представляет собой любое патологическое состояние, которое выиграло бы от лечения гуманизированным антителом к CD40 по настоящему изобретению. Это включает хронические и острые расстройства или заболевания.

Неограничивающие примеры расстройств, подлежащих лечению согласно настоящему изобретению, включают рак, гематологические злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, лейкозы и лимфоидные злокачественные новообразования, а также воспалительные, ангиогенные и аутоиммунные и иммунологические нарушения.

Термин «связанное с CD40 расстройство» или «связанное с CD40 заболевание» относится к состоянию, при котором показана модификация или устранение клеток, экспрессирующих CD40. Эти клетки включают CD40-экспрессирующие клетки, демонстрирующие аномальную пролиферацию, или CD40-экспрессирующие клетки, которые связаны с раковой или злокачественной опухолью. Более конкретные примеры видов рака, которые демонстрируют аномальную экспрессию антигена CD40, включают В-лимфобластоидные клетки, лимфому Беркитта, множественную миелому, Т-клеточные лимфомы, саркому Капоши, остеосаркому, эпидермальные и эндотелиальные опухоли, рак поджелудочной железы, рак легких, рак молочной железы, рак яичников, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак кожи (меланому), рак мочевого пузыря и рак почки. Такие расстройства включают, но не ограничиваются ими, лейкозы, лимфомы (включая В-клеточную лимфому и неходжкинскую лимфому), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; солидные опухоли, включая саркомы, такие как остеосаркома, саркома Юинга, злокачественная меланома, аденокарцинома (включая аденокарциному яичников), саркома Капоши/опухоль Капоши и плоскоклеточная карцинома. «Расстройства, связанные с CD40», также включают заболевания и расстройства иммунной системы, такие как аутоиммунные расстройства и воспалительные расстройства. Такие патологические состояния включают, но не ограничиваются ими, ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), склеродермию, синдром Шегрена, рассеянный склероз, псориаз, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), воспаление легких, астму и идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП).

Термин «останавливает рост» или «ингибирование роста» относится к ингибированию роста или пролиферации клетки, особенно типа неопластических клеток, экспрессирующей антиген CD40. Таким образом, ингибирование роста, например, значительно снижает процент опухолевых клеток в S-фазе.

«Лечение», «введение» и «обработка», когда они применяются к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции в контакт с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. Термины «лечение», «введение» и «обработка» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клетками и приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клетками. Термины «лечение», «введение» и «обработка» также относятся к обработке, например, клетки, реагентом, диагностическим агентом, связывающей композицией или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Лечение» применительно к людям, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтическому лечению, превентивным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим применениям.

«Лечение» относится к введению терапевтического агента, такого как такого как любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению или композиции, содержащей их, либо вовнутрь, либо снаружи субъекту, который имел, подозревается в наличии или предрасположен к одному или более заболеваниям или его симптомам, на которые, как известно, что терапевтический агент оказывает терапевтическое действие. Как правило, терапевтический агент вводили в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у субъекта или популяции, получавших лечение, путем индуцирования регрессии таких симптомов или ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического агента, эффективное для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также называемое «терапевтически эффективным количеством»), может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и вес субъекта, а также от способности лекарственного средства производить желаемый терапевтический эффект у субъекта. Облегчение симптома заболевания может быть оценено с помощью любых методов клинического тестирования, обычно используемых врачами или другими специалистами в области здравоохранения для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя варианты осуществления настоящего изобретения

(например, способы лечения или изделия) могут быть неэффективными для облегчения симптомов представляющего интерес заболевания у конкретного субъекта, они должны облегчать симптомы представляющего интерес заболевания у статистически значимого количества субъектов, как определено любым статистическим методом тестирования, известным в данной области техники, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Краскела-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхира-Терпстра и критерий Уилкоксона.

«Эффективное количество» включает количество, достаточное для облегчения или предотвращения появления симптома или признака медицинского состояния. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для обеспечения или облегчения диагностики. Эффективное количество для конкретного субъекта или ветеринарного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья субъекта, способ и путь и дозировка введения, а также тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или режим введения, чтобы избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

«Гомология» или «идентичность» относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положения в двух сравниваемых последовательностях заняты идентичными нуклеотидами или субъединицами аминокислотного мономера, например, если положение каждой из двух молекул ДНК занято идентичным нуклеотидом, то молекулы гомологичны в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений $\times 100\%$. Например, если 6 из 10 положений совпадают или гомологичны, когда две последовательности оптимально выровнены, две последовательности гомологичны на 60%. Как правило, при выравнивании двух последовательностей проводят сравнение для получения максимального процента гомологии.

Термины «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Также следует понимать, что все потомки могут не быть точно идентичными по содержанию ДНК из-за

преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Это определение включает мутантное потомство с идентичной функцией или биологической активностью, что и в исходных трансформированных клетках.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не обязательно, иметь место, и что такое описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «необязательно содержащий 1-3 переменные области тяжелой цепи антитела» означает, что переменная область тяжелой цепи антитела конкретной последовательности может, но не обязательно, присутствовать.

«CD40-связывающий белок» по настоящему изобретению интерпретируется в максимально широком смысле и включает антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, и любой белок, способный достичь связывания с CD40, находится в пределах объема термина. Например, CD40-связывающий белок может содержать одну или более эффекторных молекул, например, в форме конъюгата. «Эффекторная молекула» сама по себе может быть терапевтически активной (например, обладать противоопухолевой активностью или иммуноактивирующей или ингибирующей активностью) или иметь детектирующую функцию и может быть в любой форме, такой как биологически активные белки (например, ферменты), другие фрагменты антител или антител, синтетические или встречающиеся в природе полимеры, полинуклеотиды и их фрагменты (ДНК и РНК и их фрагменты), радионуклиды (в частности, радиойодиды), радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы (например, флуоресцентные соединения) или соединения, которые могут быть обнаружены с помощью NMR (ядерный магнитный резонанс) или ESR (электронный спин-резонанс) спектроскопии. Конъюгация полимера с антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению может быть достигнута обычными способами.

«Конъюгат антитело-лекарственное средство» относится к конъюгату, образованному путем связывания лекарственного средства (например, противоопухолевого агента или токсина) с антителом, что может быть достигнуто обычными способами, например, расщепляемым или нерасщепляемым линкером.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1B: активность антагонистических антител к CD40 в системе репортерного гена. На фиг. 1A и 1B показаны соответствующие результаты для 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2, соответственно. На фиг. 1A и 1B оба использовали изотип IgG1 человека в качестве отрицательного контрольного образца и CFZ533 в качестве положительного контрольного образца.

Фиг. 2A-2B: ингибирующая активность антагонистических антител к CD40 в системе анализа активации В-клеток. На фиг. 2A показано процентное ингибирование клеток CD19+CD69+ с помощью 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 2B показано MFI (средняя интенсивность флуоресценции) ингибирование клеток CD19+CD69+ с помощью 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 2A-2B использовали изотип человеческого IgG1 в качестве отрицательного контрольного образца и CFZ533 в качестве положительного контрольного образца.

Фиг. 3A-3D: ингибирующая активность антагонистических антител к CD40 в системе анализа активации клеток DC. На фиг. 3A показано MFI ингибирование клеток CD11C+CD80+ с помощью 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 3B показано MFI ингибирование клеток CD11C+CD86+ с помощью 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 3C показано ингибирование IL-12/23 p40 с помощью 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 3D показано ингибирование TNF α (фактор некроза опухоли альфа) 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2. На фиг. 3A-3D, во всех случаях использовали изотип человеческого IgG1 в качестве отрицательного контрольного образца и CFZ533 в качестве положительного контрольного образца.

Фиг. 4: эндогенная агонистическая активность антагонистических антител к CD40 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 в системе анализа активации В-клеток с изотипом IgG1 человека, CFZ533, и агонистическим антителом к CD40 9E5-SELFNS в качестве контрольного образца.

Фиг. 5A-5B: активность антагонистических антител к CD40 на мышинной модели гуморального иммунного ответа, зависящего от Т-клеток. Фиг. 5A представляет собой схему процесса. Фиг. 5B представляет собой график, показывающий результаты тестов на 7, 14, 21 и 28 дни.

Фиг. 6A-6B: активность антагонистических антител к CD40 на модели отторжения трансплантата кожи у мышей. Фиг. 6A представляет собой схему процесса. На фиг. 6B

показаны степень выживания трансплантата кожи(%) и оценка трансплантата кожи.

Фиг. 7: активность комбинаций антагонистических антител к CD40 с такролимусом (FK506) на модели отторжения трансплантата кожи у мышей. На фиг. 7A показаны степени выживаемости трансплантата кожи (%) для 9E6-L4H2 (10 мг/кг) и его комбинации с такролимусом (FK506). На фиг. 7B показаны степени выживаемости трансплантата кожи (%) для 2F12-L4H2 (10 мг/кг) и его комбинации с такролимусом (FK506). На фиг. 7C показаны оценки трансплантата кожи для 9E6-L4H2 (10 мг/кг) и его комбинации с такролимусом (FK506). На Фиг. 7D показаны оценки трансплантата кожи для 2F12-L4H2 (10 мг/кг) и его комбинации с такролимусом (FK506).

Фиг. 8: результаты ПК (фармакокинетика) антагонистических антител к CD40 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 у трансгенных мышей CD40 человека с CFZ533 в качестве контрольного образца.

Фиг. 9A-9B: ингибирующая активность антагонистических антител с мутацией Fc CD40 в системе анализа активации В-клеток. На фиг. 9A показано MFI ингибирование клеток CD19+CD69+ с помощью 9E6-L4H2 и 9E6-L4H2-AAYTE. На фиг. 9B показано MFI ингибирование клеток CD19+CD69+ с помощью 2F12-L4H2 и 2F12-L4H2-AAYTE.

Фиг. 10A-10D: ингибирующая активность антагонистов CD40 с Fc-мутацией в системе анализа активации клеток DC. На фиг. 10A показано ингибирование IL-12/23 p40 с помощью 9E6-L4H2 и 9E6-L4H2-AAYTE. На фиг. 10B показано ингибирование TNF α с помощью 9E6-L4H2 и 9E6-L4H2-AAYTE. На фиг. 10C показано ингибирование IL-12/23 p40 с помощью 2F12-L4H2 и 2F12-L4H2-AAYTE. На фиг. 10D показано ингибирование TNF α с помощью 2F12-L4H2 и 2F12-L4H2-AAYTE.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение дополнительно описано и объяснено ниже со ссылкой на примеры, но эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Экспериментальные процедуры без конкретных условий, указанных в примерах или тестовых примерах, как правило, проводили в соответствии с общепринятыми условиями или в соответствии с условиями, рекомендованными производителем исходных материалов или коммерческих продуктов. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными общепринятыми реагентами.

Пример 1. Иммунизирующие антигены CD40, последовательности для скрининга и получения антигенов

Рекомбинантный белок CD40 человека, меченный гистидином (h-CD40-his) (кат. № CD0-H5228), рекомбинантный белок CD40 человека, меченный Fc мыши (h-CD40-mFc) (кат. № CD0-H525a), рекомбинантный белок CD40 человека, меченный гистидином и биотином (hCD40-his-avi) (кат. № CD0-H82E8) и рекомбинантный белок CD40 яванского макака, меченный гистидином (cyno-CD40-his) (кат. № CD0-C52H6) представляли собой очищенные коммерчески доступные белковые реагенты, приобретенные у Acrobiosystems Inc., а источники их соответствующих последовательностей показаны в Таблице 2. Белковые реагенты можно использовать в экспериментах следующих примеров.

Таблица 2. Источники аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков

Название	Начало и конец аминокислотной последовательности	№ по GenBank
h-CD40-his	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-mFc	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-his-avi	Glu21-Arg193	P25942-1
cyno-CD40-his	Glu21-Arg193	G7PG38

Пример 2. Скрининг кроличьих моноклональных антител к CD40 и получение химерных антител человека и кролика

Моноклональные антитела к CD40 человека получали путем иммунизации 2 новозеландских белых кроликов. Иммунизирующий антиген представлял собой рекомбинантный белок CD40 человека, меченный гистидином (h-CD40-his, подготовленный в концентрации 1 мкг/мл с фосфатным буфером). Эмульгирование с адъювантами Фрейнда: полный адъювант Фрейнда (CFA) использовали для первой

иммунизации, а неполный адъювант Фрейнда (IFA) использовали для повторной иммунизации. Для каждой иммунизации использовали многократную подкожную инъекцию 400 мкг антигена. Инъекции для иммунизации осуществляли в 0, 7, 20 и 41 дни. Кровь собирали на 27 и 48 дни и анализировали, а титры антител в сыворотке кроликов определяли с помощью ELISA (иммуноферментный анализ) и FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией). Кроликов, у которых титры антител были высокими в сыворотке и имели тенденцию к стабилизации, отбирали, и каждому внутривенно вводили 400 мкг раствора антигена, подготовленного с фосфатным буфером, на 63-й день для бустерной иммунизации. На 67-й день селезенки этих кроликов собирали и добавляли меченный биотином антиген CD40. Меченые моноклональные В-клетки сортировали в 96-луночный планшет с использованием проточного цитометра. После 14 дней культивирования супернатанты собирали и проверяли с помощью ELISA и FACS на наличие клонов, которые могли связываться с CD40 человека, CD40 яванского макака и клетками Raji (линия опухолевых клеток, экспрессирующая CD40 человека), а также в общей сложности были получены 28 штаммов моноклонов В-клеток. РНК этих моноклональных клеток были извлечены и подвергнуты обратной транскрипции, а после PCR-амплификации (PCR - полимеразная цепная реакция) продукты были отправлены в компанию, занимающуюся секвенированием, для секвенирования. Наконец, были получены последовательности 28 кроличьих антител. Данные антитела подвергали скринингу с помощью анализов аффинности и активности (см. примеры 2-3) и получали 11 моноклональных антител. Последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей показаны в Таблице 3, а их последовательности CDR показаны в Таблице 4.

Таблица 3. Последовательности переменной области кроличьих моноклональных антител к CD40

№	Последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи	
5A9	VH	<u>QSVKESEGGFLKPTDTLTLTCTASRFSLSYDMSWVRQAPGNGLWIGA</u> <u>IGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTLTKMTSLTAADTATYFCARG</u> <u>WTRLDLWGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:1)
	VL	<u>ADIVLTQTASPVSGAVGGTVTINCQSSDISNLSWYQQKPGQPPELLIY</u>

		<u>AASNLAGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGGYWSGISN</u> <u>FGNGFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:2)
9E6	VH	<u>QSVRESEGGLVKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGNGLIEWIG</u> <u>AIGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMSLTAADTATYFCAR</u> <u>GWTRLDLWGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:3)
	VL	<u>ADIVLTQTPSPVSGAVGGTVTIKCQASEDISSNLAWYQQKPGQPPKLLIF</u> <u>PASNLAGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGGYWTSTSN</u> <u>FGNGFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:4)
9F10	VH	<u>QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGNGLIEWIGA</u> <u>IGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCTR</u> <u>WTRLDLWGQGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:5)
	VL	<u>ADIVLTQTESPVSGPVGGTVTINCQASEDISSNLAWYQQKPGQPPKLLIY</u> <u>AASNLAGVPSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQGAYWSSTSY</u> <u>FGNGFGGGTQVVVK</u> (SEQ ID NO:6)
4F6	VH	<u>QSVKESEGGLFKPADTLTLTCTVSRFSLSSYGVTWVRQAPGNGLIEWIGA</u> <u>IGSTGSAYYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGG</u> <u>ITAYAIWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:7)
	VL	<u>AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQISINGLAWYQQKPGQPPKLLIA</u> <u>GASNLAGVSSRFKSGSGGIEFILTISDLECADAAATYYCQSYNSFTTVF</u> <u>GGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:8)
5B8	VH	<u>QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLNSYGVSWVRQAPGNGLIEWIGA</u> <u>IGSSGSAYYASWARSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGG</u> <u>ITVYAIWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:9)
	VL	<u>AFELTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASEDITNGIAWYQQKPGQPPKLLIAG</u> <u>ASNLAGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECDAAATYYCQSYSSSYTIFG</u> <u>GGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:10)
8G10	VH	<u>QSVKESEGGLFKPTATLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGSGLEWIGGI</u> <u>ASTGTTYANWAKSRSTITRDTNLKTVTLKMTSLTAADTATYFCARGG</u> <u>ITAYAIWGPGLVTVSS</u> (SEQ ID NO:11)
	VL	<u>AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQSITINGLAWYQQKPGQPPKLLIA</u> <u>GASNLAGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECADAAATYYCQSYDSSSTVF</u> <u>GGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:12)
8C12	VH	<u>QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGNGLIEWIGG</u> <u>IGSDGSAYYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSLTVADTATYFCARG</u>

		<u>GITVYAIWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:13)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGT ^V TIK <u>CQASQ</u> SISNGLAWYQQKPGQPPKVLIV <u>GASNLAS</u> GVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYYC <u>QSYFSSS</u> STVF GGGTEVVVK (SEQ ID NO:14)
4D4	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSL <u>SSYG</u> VSWVRQAPGNGLIEWIGG <u>IGSDGSAYYASWAK</u> SRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARG <u>GITVYAIWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:15)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGT ^V TIK <u>CQASQ</u> SISNGLAWYQQKPGQPPKVLIV <u>GASNLAS</u> GVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYYC <u>QSYFSSS</u> STVF GGGTEVVVK (SEQ ID NO:16)
2F12	VH	QSVKESEGGLFKPKDTLTLTCTVSGFSL <u>SSYG</u> VSWVRQAPGNGLIEWIGG <u>IGSDGSAYYASWAK</u> SRATITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARG <u>GITVYAMWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:17)
	VL	AFELTQTPASVEAAMGGT ^V TIK <u>CQASQ</u> SISNGLAWYQQKPGQPPKLLIV <u>GASNLAS</u> GVSSRFKSGSGTEFTLSISDLECADGATYYC <u>QSYFSSS</u> STVF GGGTEVVVK (SEQ ID NO:18)
3F6	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSL <u>SSYAI</u> SWVRQAPGNGLIEWIGAI <u>DRYGTTYATWAK</u> SRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARGP <u>WYYGGDVAWTGSFDPWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:19)
	VL	AQVLTQTASPVSAAVGGT ^V TISC <u>QSSQSVAN</u> DFLSWYQQKPGQPPKL LIYGASTLASGVPSRFRGNGSGTQFTLTITGMQCDDAATYFCTGGYAGP <u>IYIFGGGTEVVVK</u> (SEQ ID NO:20)
10A4	VH	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLS <u>RNAIS</u> WVRQSPGNGLIEWIGGI <u>GSSGSAYYASWAK</u> SRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARDG <u>YAGSSWGIYYGMDPWGPGLTVTVSS</u> (SEQ ID NO:21)
	VL	AIEMTQSPPSLSASVGETVRIR <u>CLASE</u> DIYRGISWYQQKPGKPPULLIYGA <u>STLQSGVPPRFSGSGSGTDY</u> TLTIGGVQAEDAATYYC <u>LGGH</u> SYSSAGLT FGAGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

(Примечание: CDR-области переменных областей тяжелой и легкой цепей подчеркнуты и определены с использованием схемы нумерации по Кабату)

Таблица 4. Области CDR кроличьих моноклональных антител к CD40 (с использованием схемы нумерации по Кабату)

№	CDR тяжелой цепи		CDR легкой цепи	
5A9	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QSSEDISSNLS (SEQ ID NO:26)
	HCDR2	AIGGAGGTYYSWA KS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASNLAS (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWSGISNFGNG (SEQ ID NO:28)
9E6	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISSNLA (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTYYSWA KS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	PASNLAS (SEQ ID NO:30)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWTSTSNFGNG (SEQ ID NO:31)
9F10	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISSNLA (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTYYSWA KS (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASNLAS (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRLDL (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGAYWSSTSYFGNG (SEQ ID NO:32)
4F6	HCDR1	SYGVT (SEQ ID NO:33)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	AIGSTGSAYYSWA KS (SEQ ID NO:34)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAYAI (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSYNSFTTV (SEQ ID NO:38)
5B8	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASEDITNGIA (SEQ ID NO:42)
	HCDR2	AIGSSGSAYYSWA RS (SEQ ID NO:40)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)

	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYSSSYTI (SEQ ID NO:43)
8G10	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQSITNGLA (SEQ ID NO:45)
	HCDR2	GIASGTYYANWA KS (SEQ ID NO:44)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAYAI (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSYDSSSTV (SEQ ID NO:46)
8C12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWA KS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
4D4	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWA KS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
2F12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWA KS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:50)
	HCDR3	GGITVYAM (SEQ ID NO:49)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
3F6	HCDR1	SYAIS (SEQ ID NO:51)	LCDR1	QSSQSVANNDFLS (SEQ ID NO:54)
	HCDR2	AIDRYGTYYATWA KS	LCDR2	GASTLAS (SEQ ID NO:55)

		(SEQ ID NO:52)		
	HCDR3	GPWYYGGDVAWTG SFDP (SEQ ID NO:53)	LCDR3	TGGYAGPIYI (SEQ ID NO:56)
10A4	HCDR1	RNAIS (SEQ ID NO:57)	LCDR1	LASEDIYRGIS (SEQ ID NO:60)
	HCDR2	GIGSSGSAYYASWA KS (SEQ ID NO:58)	LCDR2	GASTLQS (SEQ ID NO:61)
	HCDR3	DGYAGSSWGIYYGM DP (SEQ ID NO:59)	LCDR3	LGGHSYSSAGLT (SEQ ID NO:62)

Полученные последовательности переменной области соединяли с последовательностью константной области IgG1 человеческого антитела (с мутацией N297A, в соответствии со схемой нумерации Eu) и последовательностью константной области каппа-цепи человека соответственно, чтобы получить последовательности химерного антитела человека и кролика. Последовательности химерных антител были вставлены в векторы экспрессии путем молекулярного клонирования, и химерные антитела человек и кролика были получены с использованием клеточной системы экспрессии HEK293.

Пример 3. Связывание химерных антител человека и кролика к CD40 с клетками Raji

Клетки Raji относятся к линии опухолевых клеток, которая сверхэкспрессирует CD40 человека. Клетки Raji 2E5 инокулировали на 96-луночный планшет. Добавляли 100 мкл тестируемого антитела с максимальной конечной концентрацией 100 нМ. Антитело разводили в 5 раз до 8 концентраций. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Планшет промывали один раз промывочным буфером и добавляли AF647-конъюгированное антитело к IgG человека (Jackson Immunoresearch Laboratories, кат. № 205-609-088) в соотношении разведения 1:500. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Планшет промывали один раз промывочным буфером и измеряли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра. Рассчитывали значения EC₅₀

связывания антител к CD40 для CD40. Антагонистическое антитело к CD40 CFZ533 (т.е. искалимаб, Nova) использовали в качестве положительного контрольного образца, а последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи получали из последовательности 5 и последовательности 2 US8277810B, соответственно.

Результаты в таблице 5 показывают, что 2F12, 3F6, 4F6, 5A9, 5B8, 9E6 и 10A4 все имеют более сильное связывание EC_{50} , чем CFZ533, в то время как другие антитела (взяв 8E1 в качестве примера, последовательности не показаны) имеют более слабую EC_{50} , чем CFZ533.

Таблица 5. FACS-связывание EC_{50} (нМ) химерных антител человека и кролика к CD40 для клеток Raji

№	Связывание EC_{50} (нМ)
2F12	0,412
3F6	1,506
4F6	0,258
5A9	0,671
5B8	0,435
8E1	2,511
9E6	0,608
10A4	0,467
CFZ533	2,410

Пример 4. Активность клеток с репортерным геном при обработке химерными антителами человека и кролика к CD40

Клетки HEK-Blue CD40L были приобретены у Invivogen (кат. № hkb-cd40). Клетки стабильно трансфицировали геном CD40 человека и геномом SEAP (секретируемая форма человеческой эмбриональной щелочной фосфатазы), опосредованным NF- κ B. Уровень активации сигнального пути CD40 можно охарактеризовать путем обнаружения секретируемой SEAP в супернатанте с использованием QUANTI-Blue, субстрата SEAP. В этом эксперименте антагонистическую активность антител против CD40 *in vitro* оценивали в соответствии с IC_{50} путем обнаружения активации клеток HEK-Blue CD40L с помощью

CD40L. Клетки HEK-Blue CD40L культивировали в среде DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), содержащей 10% FBS (фетальная бычья сыворотка), 100 мкг/мл зеоцина и 30 мкг/мл бластицидина, и пассировали 2-3 раза в неделю в соотношении 1:5 или 1:10. Во время пассажа среду удаляли пипетированием, и клеточный слой промывали 5 мл 0,25% панкреатина. Затем панкреатин удаляли пипетированием, клетки расщепляли в инкубаторе в течение 3–5 мин, а затем добавляли свежую среду для ресуспендирования клеток. 100 мкл клеточной суспензии добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток с плотностью 5×10^5 клеток/мл. Среда представляла собой DMEM, содержащую 10% FBS, 100 мкг/мл зеоцина и 30 мкг/мл бластицидина. На периферию 96-луночного планшета добавляли только 100 мкл стерильной воды. Планшет инкубировали в инкубаторе в течение 24 ч (37 °C, 5% CO₂). После клеточной адгезии последовательно разбавленные тестовые антитела добавляли при 100 мкл/лунку и планшет инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Добавляли 25 нг/мл CD40L (R&D, кат. № 2706-CL) и 2 мкг/мл антитела против His (R&D, кат. № MAB050), и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 20-24 ч (37 °C, 5% CO₂). 20 мкл клеточного супернатанта отбирали из каждой лунки в новый 96-луночный планшет с плоским дном и добавляли 180 мкл раствора субстрата QUANTI-Blue. Планшет инкубировали в темноте в инкубаторе в течение 1-3 часов. Поглощение при 630 нм измеряли с помощью микропланшетного ридера (Thermo MultiSkanFc), и значения IC₅₀ рассчитывали и использовали для оценки клеточной активности при обработке антителами к CD40 *in vitro*. См. таблицу 6 Результаты показывают, что 2F12, 3F6, 4D4, 4F6, 5A9, 5B8, 8C12, 8G10, 9E6, 9F10 и 10A4 все имеют аналогичную или немного более высокую ингибирующую активность IC₅₀ в отношении репортерных клеток, чем CFZ533, в то время как другие антитела (взяв 2F1 в качестве примера, последовательности не показаны) имеют более низкую IC₅₀, чем CFZ533.

Таблица 6. IC₅₀ активности клетки с репортерным геном при обработке антителами к CD40 (нМ)

№	IC ₅₀ (нМ)
2F12	0,1717

3F6	0,3778
4D4	0,197
4F6	0,1823
5A9	0,3173
5B8	0,2033
8C12	0,1729
8G10	0,1556
9E6	0,2206
9F10	0,2171
10A4	0,2172
2F1	0,6849
CFZ533	0,2715

Пример 5. Гуманизация антител к CD40

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей кроличьих антител 2F12, 3F6, 9E6 и 10A4 сравнивали с базой данных антител GermLine с получением матриц зародышевой линии человека с высокой гомологией. Матрицы зародышевой линии человека для гуманизации конечных антител показаны в таблице 7.

Таблица 7. Матрицы зародышевой линии человека для гуманизации антител

№	Переменная область тяжелой цепи		Переменная область легкой цепи	
	FR1-FR3	FR4	FR1-FR3	FR4
2F12	IGHV2-26*01	IGHJ1*01	IGkV1-13*02	IGKJ4*01
3F6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-13*02	
9E6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-9*01	
10A4	IGHV4-4*08		IGkV1-6*01	

Области CDR кроличьих антител прививали к выбранным матрицам зародышевой линии человека для замены переменных областей зародышевой линии человека и рекомбинировали с соответствующими константными областями IgG человека (предпочтительно, тяжелая цепь представляла собой IgG1 с мутацией N297A, а легкая цепь представляла собой κ). Затем на основе трехмерных структур антител кролика выполняли

обратную мутацию на внедренных остатках, остатках, которые непосредственно взаимодействуют с областями CDR, и остатках, которые сильно влияют на конформации VL и VH, и выполняли мутацию на потенциальных сайтах риска посттрансляционной модификации для получения конечных гуманизованных молекул. В качестве примера показаны гуманизованные последовательности варибельной области легкой и тяжелой цепей, соответствующие 2F12 и 9E6 (см. таблицу 8 и таблицу 9), где L представляет легкую цепь, H представляет тяжелую цепь, а числа после L и H представляют собой различные версии гуманизованных последовательностей, содержащих различные обратные мутации.

Таблица 8. Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи гуманизованного 9E6

Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи		№ последовательности
9E6-L1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQK PGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCQGGYWTSTSNFGNVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:63
9E6-L2	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQK PGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCQGGYWTSTSNFGSGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:64
9E6-L3	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQK PGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCQGGYWTSTSNFGTGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:65
9E6-L4	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQK PGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:66
9E6-H1	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIR QPPGKGLEWIGAIGGAGGTYASWAKSRVTISVDTSL NQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGLV TVSS	SEQ ID NO:67
9E6-H2	QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIR QPPGKGLEWIGAIGGAGGTYASWAKSRVTISVDTSL	SEQ ID NO:68

	NQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGLV TVSS	
--	---	--

(CDR, определенные схемой нумерации по Кабату, подчеркнуты.)

Во время гуманизации 9E6 были получены следующие LCDR3:

>LCDR3 9E6-L1

QGGYWTSTSNFGNV (SEQ ID NO: 69)

>LCDR3 9E6-L2

QGGYWTSTSNFGSG (SEQ ID NO: 70)

>LCDR3 9E6-L3

QGGYWTSTSNFGTG (SEQ ID NO: 71)

>LCDR3 9E6-L4

QGGYWTSTSNFGQG (SEQ ID NO: 72)

>Общая формула для LCDR3s 9E6-Ls

QGGYWTSTSNFGX₉X₁₀ (SEQ ID NO:73), где X₉ выбран из группы, состоящей из N, S, T и Q, и X₁₀ выбран из группы, состоящей из V и G.

5A9, 9E6 и 9F10 имеют следующую общую структуру формулы:

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены SYDMS (SEQ ID NO:23), AIGGAGGTYASWAKS (SEQ ID NO: 24) и GWTRLDL (SEQ ID NO: 25), соответственно;

LCDR1 представлен QX₁SEDISSNLX₂ (SEQ ID NO: 74), где X₁ выбран из группы, состоящей из A и S, и X₂ выбран из группы, состоящей из A и S;

LCDR2 представлен X₃ASNLAS (SEQ ID NO: 75), где X₃ выбран из группы, состоящей из A и P;

LCDR3 представлен QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀ (SEQ ID NO: 76), где X₄ выбран из группы, состоящей из A и G, X₅ выбран из группы, состоящей из S и T, X₆ выбран из группы, состоящей из S и G, X₇ выбран из группы, состоящей из T и S, X₈ выбран из группы, состоящей из N и Y, X₉ выбран из группы, состоящей из N, S, T и Q, и X₁₀ выбран из группы, состоящей из V и G.

Таблица 9. Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи гуманизированного 2F12

Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи		№ последовательности
2F12-L1	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQ</u> SISNVLA <u>WY</u> QQ KPGKPPKLLIVGASN <u>LA</u> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QSYFSSS</u> TVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:77
2F12-L2	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQ</u> SISQGLA <u>WY</u> QQ KPGKPPKLLIVGASN <u>LA</u> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QSYFSSS</u> TVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:78
2F12-L3	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQ</u> SISSGLA <u>WY</u> QQ KPGKPPKLLIVGASN <u>LA</u> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QSYFSSS</u> TVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:79
2F12-L4	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQ</u> SISTGLA <u>WY</u> QQ KPGKPPKLLIVGASN <u>LA</u> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QSYFSSS</u> TVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:80
2F12-H1	EVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL <u>SSYG</u> VSWIRQ PPGKALEWLAGIGSDGSAYYASWAK <u>SRL</u> TISRDTNLK QVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAMWGQGT VTVSS	SEQ ID NO:81
2F12-H2	EVTVKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL <u>SSYG</u> VSWIRQ PPGKALEWLGIGSDGSAYYASWAK <u>SRL</u> TISRDTNLK QVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAMWGQGT VTVSS	SEQ ID NO:82

(CDR, определенные схемой нумерации по Кабату, подчеркнуты.)

Во время гуманизации 2F12 были получены следующие LCDR1:

>LCDR1 2F12-L1

QASQSISNVLA (SEQ ID NO: 83)

>LCDR1 2F12-L2

QASQSISQGLA (SEQ ID NO: 84)

>LCDR1 2F12-L3

QASQSISSGLA (SEQ ID NO: 85)

>LCDR1 2F12-L4

QASQSISTGLA (SEQ ID NO: 86)

>Общие формулы LCDR1 2F12-L

QASQSISX₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO: 87), где X₂₄ выбран из группы, состоящей из N, Q, S и T, и X₂₅ выбран из группы, состоящей из V и G.

4F6, 5B8, 8G10, 8C12, 4D4 и 2F12 имеют следующую общую структуру формулы:

HCDR1 представлен SYGVX₁₁ (SEQ ID NO: 88), где X₁₁ выбран из группы, состоящей из S и T;

HCDR2 представлен X₁₂IX₁₃SX₁₄GX₁₅X₁₆YYAX₁₇WAX₁₈S (SEQ ID NO: 89), где X₁₂ выбран из группы, состоящей из A и G, X₁₃ выбран из группы, состоящей из G и A, X₁₄ выбран из группы, состоящей из T, S и D, X₁₅ выбран из группы, состоящей из T и S, X₁₆ выбран из группы, состоящей из T и A, X₁₇ выбран из группы, состоящей из S и N, и X₁₈ выбран из группы, состоящей из K и R;

HCDR3 представлен GGITX₁₉YAX₂₀ (SEQ ID NO: 90), где X₁₉ выбран из группы, состоящей из A и V, и X₂₀ выбран из группы, состоящей из I и M;

LCDR1 представлен QASX₂₁X₂₂IX₂₃X₂₄X₂₅LA (SEQ ID NO: 91), где X₂₁ выбран из группы, состоящей из Q и E, X₂₂ выбран из группы, состоящей из S и D, X₂₃ выбран из группы, состоящей из S и T, X₂₄ выбран из группы, состоящей из N, Q, S и T, и X₂₅ выбран из группы, состоящей из V и G.

LCDR2 представлен GASNLAS (SEQ ID NO: 37);

LCDR3 представлен QSYX₂₆X₂₇SX₂₈X₂₉TX₃₀ (SEQ ID NO: 92), где X₂₆ выбран из группы, состоящей из F и Y, X₂₇ выбран из группы, состоящей из S, D и N, X₂₈ выбран из группы, состоящей из S и F, X₂₉ выбран из группы, состоящей из S, T и Y, и X₃₀ выбран из группы, состоящей из V и I.

Различные варианты легкой и тяжелой цепей каждого из антител кролика объединяли в пары, экспрессировали и очищали. Названия представляют собой комбинации номера варибельной области тяжелой цепи и номера варибельной области легкой цепи. Например, «2F12-L1H1» относится к антителу с SEQ ID NO: 63 как VH и SEQ ID NO: 67 как VL. В константных областях легкой и тяжелой цепи использовали последовательность константной области IgG1 человека (с мутацией N297A, согласно схеме нумерации Eu) и последовательность константной области каппа-цепи человека, соответственно.

В качестве примера, ниже показаны последовательности гуманизированных молекул 2F12-L4H2 (с использованием легкой цепи 2F12-L4 и тяжелой цепи 2F12-H2) и 9E6-L4H2 (с использованием легкой цепи 9E6-L4 и тяжелой цепи 9E6-H2), где константные области легкой и тяжелой цепи использовали последовательность константной области IgG1 человека (с мутацией N297A, согласно схеме нумерации Eu) и последовательность константной области каппа-цепи человека, соответственно.

>9E6-L4H2 HC:

QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIGGAG
GTYYASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 93

>9E6-L4H2 LC:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQKPGKPKLLIFPASNLASG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 94

>2F12-L4H2 HC:

EVTVKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSSYGVSWSWIRQPPGKALEWLGGIGSDG
SAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAMWGQGLTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 95

>2F12-L4H2 LC:

AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISTGLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYFSSSSTVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEOLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 96

Были сконструированы константные области тяжелой цепи вышеуказанных антител. Антитела использовали константную область IgG1 человека и содержали 5 точечных мутаций: L234A, L235A, M252Y, S254T и T256E (в соответствии со схемой нумерации Eu), а константная область легкой цепи и переменные области легкой и тяжелой цепи были неизменными. Вновь полученные антитела представляли собой 2F12-L4H2-AAYTE и 9E6-L4H2-AAYTE, полные последовательности тяжелой цепи которых показаны ниже:

>9E6-L4H2-AAYTE HC:

QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIGGAG
GTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLR
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 97

>2F12-L4H2-AAYTE HC:

EVTVKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGGIGSDG
SAYIASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYAMWGQGLTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 98

Константные области тяжелой и легкой цепей подчеркнуты.

Иллюстративные IgG Fcs показаны ниже:

> IgG1-Fc (N297A)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 99

> IgG1-Fc (AAYTE)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 100

Пример 6. Связывание гуманизированных антител к CD40 с клетками Raji

Клетки Raji высоко экспрессируют CD40 человека на клеточной поверхности и, таким образом, могут быть использованы для обнаружения связывания антагонистических антител к CD40 с CD40 человека на клеточной поверхности.

Клетки Raji высевали на 1,5E5/лунку и добавляли различные концентрации антагонистических антител к CD40. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. После двух промывок буфером FACS (PBS + 2% FBS) (PBS - фосфотно-солевой буферный раствор) добавляли вторичное антитело (конъюгированное с Alexa Flour488 антитело к IgG человека (H+L)) и планшет инкубировали при 4 °C в течение 0,5 часа. После двух промывок

буфером FACS интенсивность флуоресценции на поверхности клетки измеряли с помощью проточной цитометрии (BD FACS Celesta).

Согласно результатам, приведенным в таблице 10, 2F12-L4H2, 9E6-L4H2 и CFZ533 обладают аналогичными способностями связываться с CD40 человека на поверхности клеток Raji.

Таблица 10. Результаты EC₅₀ для связывания FACS гуманизированных антител к CD40 с клетками Raji

№ антитела	Связывание EC ₅₀ (нМ)	№ антитела	Связывание EC ₅₀ (нМ)
2F12	0,479	9E6	0,895
2F12-L1H1	0,549	9E6-L1H1	1,083
2F12-L1H2	0,469	9E6-L1H2	1,048
2F12-L2H1	0,516	9E6-L2H1	1,993
2F12-L2H2	0,516	9E6-L2H2	1,660
2F12-L3H1	0,456	9E6-L3H1	1,065
2F12-L3H2	0,762	9E6-L3H2	1,148
2F12-L4H1	0,508	9E6-L4H1	0,928
2F12-L4H2	0,589	9E6-L4H2	0,870
CFZ533	1,009		

Пример 7. Анализы аффинности антител к CD40 с CD40 человека и CD40 яванского макака

Испытуемое антитело захватывали с аффинностью на чипе к Fc человека, и серии концентраций His-меченого антигена CD40 человека или яванского макака позволяли течь по поверхности чипа. Сигналы реакции были обнаружены в режиме реального времени с использованием прибора Viacore, и, таким образом, были получены кривые связывания и диссоциации. Буфер, используемый в эксперименте, представлял собой буферный раствор HBS-EP + 10× (кат. № BR-1006-69, GE), разбавленный до 1× (pH 7,4) деионизированной водой. Подгонку проводили на данных, полученных в эксперименте, с использованием модели связывания (1:1) для получения значений аффинности. См. таблицу 11.

9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 имеют сходные константы связывания для CD40 человека с CFZ533, 9E6-L4H2 имеет более высокую аффинность связывания с CD40 яванского макака, а 2F12-L4H2 имеет слегка низкую аффинность связывания с CD40 яванского макака.

Таблица 11. Аффинности SPR антагонистических антител к CD40 с CD40 различных видов

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	K _D (M)
CD40 человека	2F12-L4H2	7,58E+05	2,06E-03	2,71E-09
	9E6-L4H2	4,13E+05	2,21E-04	5,36E-10
	CFZ533	6,88E+05	1,41E-04	2,05E-10
CD40 яванского макака	2F12-L4H2	1,17E+07	4,14E-01	3,53E-08
	9E6-L4H2	5,14E+05	6,23E-05	1,21E-10

Пример 8: Активность клеток с репортерным геном при обработке антителами к CD40

Клетки HEK-Blue CD40L были приобретены у Invivogen (кат. № hkb-cd40). Клетки стабильно трансфицировали геном CD40 человека и геномом SEAP, опосредованным NF-κB. Уровень активации сигнального пути CD40 можно охарактеризовать путем измерения количества секретируемой SEAP в супернатанте с использованием QUANTI-Blue, субстрата SEAP. В анализах измеряли ингибирующее действие антагонистических антител к CD40 на CD40L-индуцированную активацию клеток HEK-Blue CD40L и оценивали клеточную активность при обработке антагонистическими антителами к CD40 *in vitro* на основе IC₅₀.

Клетки HEK-Blue CD40L культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 мкг/мл нормоцина, 100 мкг/мл зеоцина и 30 пг/мл бластицидина, с 2-3 пассажами в неделю. Клетки HEK-Blue CD40L высевали при 5E4/лунку в 96-луночный планшет для культивирования клеток (среда представляла собой DMEM, 10% FBS, 100 мкг/мл нормоцина) и инкубировали в течение ночи. После адгезии клеток добавляли серийно разбавленные тестовые антитела при 100 мкл/лунку и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Добавляли CD40L-his (R&D, 2706-CL-025) и антитело к His (R&D, MAB050-500), и планшет инкубировали в течение ночи. После центрифугирования клеток 20 мкл

клеточного супернатанта переносили в новый 96-луночный белый планшет и добавляли 180 мкл раствора субстрата QUANTI-Blue. Планшет инкубировали в темноте в течение 15 мин. Поглощение при 620 нм измеряли с помощью считывателя микропланшетов Envision, а значения IC_{50} рассчитывали и использовали для оценки клеточной активности при обработке антагонистическими антителами к CD40 *in vitro*.

Согласно результатам, представленным в таблице 12 и на фиг. 1A-1B, 9E6-L4H2 и CFZ533 обладают аналогичной ингибирующей активностью в отношении системы репортерного гена, а 2F12-L4H2 обладает лучшей ингибирующей активностью, чем CFZ533.

Таблица 12. IC_{50} для ингибирования активности клеток CD40 с репортерным геном при обработке антителом к CD40

	№ антитела	IC_{50} (нМ)
Анализ 1	2F12-L4H2	0,18
	CFZ533	0,36
Анализ 2	9E6-L4H2	0,50
	CFZ533	0,35

Пример 9. Ингибирующая активность антител к CD40 в системе анализа активации В-клеток

CD40 высоко экспрессируется в В-клетках, и CD40L при связывании с CD40 может индуцировать активацию В-клеток и повышать экспрессию ряда маркеров активации. Антагонистические антитела к CD40 блокируют связывание CD40L с CD40, тем самым устраняя процесс иммунной активации В-клеток.

РВМС человека высевали при 2E5/лунку, 50 мкл/лунку в 96-луночный планшет для культивирования клеток (среда представляла собой RPMI-1640, 10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин). Последовательно разбавленные тестируемые антитела добавляли при 50 мкл/лунку и клетки совместно инкубировали при 37 °C в 5% CO₂ в течение 0,5 часа. CD40L-his и антитело к His добавляли в каждую лунку для ночной стимуляции. На следующий день планшет центрифугировали, супернатант удаляли и клетки дважды промывали буфером FACS и окрашивали при комнатной температуре в течение 15 мин 100 мкл фиксируемого

красителя жизнеспособности EF780 (Invitrogen, 65086514), разбавленного в соотношении 1:1000. Клетки дважды промывали, а затем блокировали при комнатной температуре в течение 10 мин 100 мкл Fc-блокатора человека (BD, 564220), разбавленного в соотношении 1:200. После центрифугирования клетки инкубировали при 4 °C в течение 0,5 ч антителами для проточной цитометрии (PerCP/Cyanine5.5 к CD19 человека (Biolegend, 302230) и APC к CD69 человека (Biolegend, 310910)), разбавленными в соотношении 1:200. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки дважды промывали буфером FACS и затем ресуспендировали в 200 мкл PBS, а интенсивность флуоресценции на поверхности клетки измеряли с помощью проточной цитометрии (BD FACS Celesta).

Согласно результатам, представленным в таблице 13 и на фиг. 2А-2В, 9Е6-Л4Н2 обладает аналогичной активностью ингибирования активации В-клеток, что и CFZ533. 2F12-Л4Н2 обладает большей активностью ингибирования В-клеток, чем CFZ533.

Таблица 13. Ингибирующая активность гуманизированных антител к CD40 в системе анализа активации В-клеток

№ антитела	CD19+CD69+%		CD19+CD69+ MFI	
	IC ₅₀ (нМ)	Степень максимального ингибирования	IC ₅₀ (нМ)	Степень максимального ингибирования
CFZ533	0,14	95%	0,07	110%
9Е6-Л4Н2	0,14	98%	0,07	110%
2F12-Л4Н2	0,04	93%	0,03	111%

После добавления антитела сигнал CD19+CD69+ был ниже фона, вероятно, потому, что фоновая активация В-клеток была в некоторой степени ингибирована (в дополнение к ингибированию сигнала, индуцированного CD40L).

Пример 10. Ингибирующая активность антител к CD40 в системе анализа активации DC клеток

CD40 высоко экспрессируется на дендритных клетках (DC), и CD40L при связывании с CD40 может индуцировать активацию DC, повышать экспрессию нескольких

маркеров активации на поверхности DC клеток и стимулировать секрецию нескольких воспалительных факторов из DC, дополнительно усиливая иммунные ответы. Антагонистические антитела к CD40 блокируют связывание CD40L с CD40, тем самым устраняя процесс иммунной активации клеток DC.

Моноциты сортировали и обогащали из свежих первичных периферической крови человека PBMC с использованием набора для сортировки CD14 человека EasySep™ (Stemcell, 19359) и дифференцировали в течение 6 дней со средой RPMI-1640 (10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин), 50 нг/мл IL-4 (PeproTech, 200-04) и 50 нг/мл GM-CSF (PeproTech, 300-03). На 7 день дифференцированные клетки DC высевали при 1E5/лунку в 96-луночный планшет для культивирования клеток. В лунки добавляли серийно разбавленные тестовые антитела и клетки совместно инкубировали при 37 °C в 5% CO₂ в течение 0,5 часа. CD40L-his и антитело к His затем добавляли в каждую лунку в конечных концентрациях. Через 48 ч культивирования уровень активации клеток DC измеряли с помощью проточной цитометрии: после центрифугирования супернатант удаляли, и клетки дважды промывали буфером FACS (PBS + 2% FBS) и окрашивали при комнатной температуре в течение 15 мин 100 мкл фиксируемого красителя жизнеспособности EF780 (Invitrogen, 65086514), разбавленного в соотношении 1:1000. Клетки дважды промывали, а затем блокировали при комнатной температуре в течение 10 мин 100 мкл Fc-блокатора человека (BD, 564220), разбавленного в соотношении 1:200. После центрифугирования клетки инкубировали при 4 °C в течение 0,5 ч с антителами проточной цитометрии (Alexa Fluor® 700 к CD11c человека (Biolegend, 337220), Brilliant Violet 421™ к CD80 человека (Biolegend, 305221) и APC к CD86 человека (Biolegend, 305412)), разбавленными в соотношении 1:200. После центрифугирования супернатант удаляли, клетки дважды промывали буфером FACS и затем ресуспендировали в 200 мкл PBS, а интенсивность флуоресценции на поверхности клетки измеряли с помощью проточной цитометрии (BD FACS Celesta).

Кроме того, уровень секреции цитокинов в супернатанте измеряли через 24 ч (TNF α , Cisbio, 62HTNFAPPEG) и 48 ч (IL-12/23 p40, Novus, VAL121) культивирования.

В соответствии с результатами, показанными в таблице 14 и на фиг. 3A-3D, 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 обладают аналогичной активностью ингибирования клеток DC по сравнению с контрольным антителом CFZ533.

Таблица 14. Ингибирующая активность гуманизированных антител к CD40 в системе анализа активации DC клеток

№ антитела	IC ₅₀ (нМ) в системе анализа активации DC клеток			
	CD80 MFI	CD86 MFI	IL-12/23 p40	TNF α
CFZ533	1,19	1,93	0,68	0,35
9E6-L4H2	3,44	3,72	1,85	0,7
2F12-L4H2	0,78	0,52	0,68	0,30

Пример 11. Агонистическая активность гуманизированных антител к CD40 в системе анализа активации В-клеток

CD40, который принадлежит к суперсемейству рецепторов TNF, опосредует специфическую и неспецифическую активацию нисходящих сигнальных путей при связывании с лигандом CD40L или перекрестном связывании антителами. Следовательно, фоновую агонистическую активность антагонистических антител к CD40 на В-клетках можно измерить без добавления CD40L.

PBMC человека высевали при 2E5/лунку, 100 мкл/лунку в 96-луночный планшет для культивирования клеток (среда представляла собой RPMI-1640, 10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин). Последовательно разбавленные тестируемые антитела добавляли при 100 мкл/лунку, и клетки инкубировали в течение ночи при 37 °C в 5% CO₂. На следующий день планшет центрифугировали и супернатант удаляли и клетки дважды промывали буфером FACS и окрашивали при комнатной температуре в течение 15 мин 100 мкл фиксируемого красителя жизнеспособности EF780, разбавленного в соотношении 1:1000. Клетки дважды промывали, а затем блокировали при комнатной температуре в течение 10 мин 100 мкл Fc-блокатора человека, разбавленного в соотношении 1:200. После центрифугирования клетки инкубировали при 4 °C в течение 0,5 ч антителами для проточной цитометрии (PerCP/Cyanine5.5 к CD19 человека (Biolegend, 302230) и APC к CD69 человека (Biolegend, 310910)), разбавленными в соотношении 1:200. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, клетки дважды промывали буфером FACS и затем ресуспендировали в 200 мкл PBS, а интенсивность флуоресценции на поверхности клетки измеряли с помощью

проточной цитометрии (BD FACS Celesta).

Согласно результатам, показанным на фиг. 4, агонистическое антитело к CD40 9E5-SELFNS (WO2020108611A1) дозозависимым образом активировало В-клетки, в то время как 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 по-прежнему не проявляли значительной агонистической активности в отношении В-клеток при 2,5 нМ.

Пример 12. Модель мышинового Т-клеточно-зависимого антительного ответа (TDAR)

Самки трансгенных мышей CD40 человека в возрасте 6-7 недель были приобретены у Biocytogen Jiangsu Co., Ltd. Условия содержания: SPF (свободный от специфических патогенов); лицензия на производство: SCXK (Цзянсу)-2016-0004; номер сертификации трансгенной мыши CD40 человека: 320726200100167773. После прибытия животных акклиматизировали в течение 7 дней и случайным образом группировали. В день 0 эксперимента одну из мышей в каждой группе подвергали забору крови с последующей внутрибрюшинной инъекцией. В день 1 каждой мыши внутрибрюшинно вводили 50 мкг KLH (KLH (гемоцианин лимфы улитки):полный адъювант Фрейнда (CFA) = 1:1 эмульгированный иммунный комплекс) для иммунизации. На 15 день эксперимента каждой мыши внутрибрюшинно вводили 50 мкг KLH (KLH:неполный адъювант Фрейнда (IFA) = 1:1 эмульгированный иммунный комплекс) для второй иммунизации. Каждой группе вводили внутрибрюшинно два раза в неделю, и образцы крови объемом около 150 мкл собирали из орбитального венозного сплетения на 7, 14, 21 и 28 день. Цельную кровь оставляли стоять при комнатной температуре в течение 1-4 ч и центрифугировали при 7000 об/мин при 4 °C в течение 10 мин для отделения сыворотки, и сыворотку хранили при -80 °C перед использованием. Конкретный экспериментальный процесс показан на фиг. 5А.

Конкретные схемы введения показаны в таблице 15. Сыворотку мыши разделяли еженедельно и анализировали с помощью ELISA на уровень IgG, специфичного к KLH.

Таблица 15. Экспериментальные схемы введения для мышинной модели TDAR

	Группа	Лекарственное средство	N	Доза	Частота
трансгенная мышь hCD40	1	IgG1	5	1 мг/кг	BIW (дважды в неделю)
	2	CFZ533	5	1 мг/кг	BIW

	3	CFZ533	5	0,3 мг/кг	BIW
	4	9E6-L4H2	5	1 мг/кг	BIW
	5	9E6-L4H2	5	0,3 мг/кг	BIW
	6	2F12-L4H2	5	1 мг/кг	BIW
	7	2F12-L4H2	5	0,3 мг/кг	BIW

Согласно результатам, показанным на фиг. 5B и в таблице 16, 1 мг/кг антагонистических антител к CD40 значительно ингибировал продукцию IgG, специфичного к KLH, после двух иммунизаций. Низкие дозы (0,3 мг/кг) 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 лучше ингибировали продукцию IgG к KLH, чем та же доза CFZ533 после двух иммунизаций.

Таблица 16. Ингибирование продукции IgG антителами к CD40 после иммунизации (0,3 мг/кг)

	День 7	День 14	День 21	День 28
Перед введением	0	0	0	0
IgG1	1,5±0,4	247,4±33,1	2187±1248	4773±2280
CFZ533 (0,3 мг/кг)	0,04±0,01	30,9±10,8	845±423	3043±1600
9E6-L4H2 (0,3 мг/кг)	0,002±0,001	0,02±0,01	0	18,25±8,9
2F12-L4H2 (0,3 мг/кг)	0,22±0,14	33,4±25,8	175,5±103	805,7±415,6

Пример 13. Модель отторжения трансплантата кожи мыши

Самцов мышей Balb/c в возрасте 6 недель закупили в отделе управления лабораторными животными Шанхайского института исследований планируемого родительства. Условия проживания: SPF; номер сертификата: 20180006023393.

Самки трансгенных мышей CD40 человека в возрасте 6-7 недель были приобретены у Biocytogen Jiangsu Co., Ltd. Условия проживания: SPF; номер сертификата: 320726200100179778.

После прибытия животных акклиматизировали в течение 7 дней и случайным образом группировали. На день -2 эксперимента мышам внутрибрюшинно вводили такролимус FK506 или антагонистические антитела к CD40. В день 0 эксперимента

донорных мышей Balb/c и мышей C57BL6/J анестезировали 4% хлоралгидратом. Хвосты мышей-доноров удаляли, а полные круги кожи длиной 1 см выделяли из хвостов. Волосы на спине акцепторных мышей удаляли и делали разрез вдоль кожного слоя. Равный участок кожи удаляли, сохраняя при этом жировую ткань спины и соединительную ткань. Донорскую кожу помещали на место разреза акцепторных мышей, и разрез закрывали клеем. Затем мышей помещали обратно в клетки для восстановления. Конкретный экспериментальный процесс показан на фиг. 6А.

Мышам вводили дозы в соответствии со схемами введения, приведенными в таблице 17. Через 7 дней восстановления ежедневно наблюдали выживаемости кожи мышей и регистрировали оценки отторжения. Система оценки является следующей: 3 - кожа не краснеет и гладкая; 2 - часть кожи краснеет, теряет блеск и сухая; 1 - большая часть кожи краснеет, не имеет линий и сжимается; 0 - отторжение трансплантата приводит к некрозу 80% кожи.

Таблица 17. Схемы введения для модели отторжения трансплантата кожи мыши

	Группа	Лекарственное средство	N	Доза	Способ введения
Донор: Balb/c Акцептор: трансгенная мышь hCD40 C57BL6/1	1	Контрольная группа (аллотрансплантат)	2	IgG1 10 мг/кг	в/б (внутрибрюши нно)
	2	Модельная группа (ксенотрансплантат)	7	IgG1 10 мг/кг	в/б
	3	CFZ533	7	3 мг/кг	в/б
	4	CFZ533	7	10 мг/кг	в/б
	5	9E6-L4H2	7	3 мг/кг	в/б
	6	9E6-L4H2	7	10 мг/кг	в/б
	7	2F12-L4H2	7	3 мг/кг	в/б
	8	2F12-L4H2	7	10 мг/кг	в/б
	9	Такролимус	6	3 мг/кг	в/б
	10	9E6-L4H2 + такролимус	6	10 мг/кг + 3 мг/кг	в/б
	11	2F12-L4H2 + такролимус	6	10 мг/кг + 3 мг/кг	в/б

В соответствии с результатами, показанными на фиг. 6В и в таблицах 18-20, оба антагонистических антитела к CD40 значительно улучшили оценку трансплантата кожи мыши и увеличили время выживаемости трансплантата кожи по сравнению с модельной группой. Поскольку невозможно было определить ранее, было ли отторжение, оценка трансплантата кожи начиналась с 8-го дня. 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 продемонстрировали

лучшую активность против отторжения трансплантата, чем контрольное антитело CFZ533.

Таблица 18. Оценка выживаемости трансплантата кожи в день 15 (%) для антител к CD40

	Коэффициент выживаемости трансплантата кожи (%)		Коэффициент выживаемости трансплантата кожи (%)
Контрольный образец	100%	Контрольный образец	100%
Модель	0%	Модель	0%
CFZ533 (3 мг/кг)	0%	CFZ533 (10 мг/кг)	0%
9E6-L4H2 (3 мг/кг)	28,5%	9E6-L4H2 (10 мг/кг)	14,3%
2F12-L4H2 (3 мг/кг)	28,5%	2F12-L4H2 (10 мг/кг)	42,9%

Таблица 19. Баллы трансплантата кожи для антител к CD40 (3 мг/кг)

	8 дней	10 дней	15 дней	20 дней
Контрольный образец	3	3	3	3
Модель	0,7	0	0	0
CFZ533 (3 мг/кг)	2,7	2,1	0	0
9E6-L4H2 (3 мг/кг)	3	2,7	0,6	0
2F12-L4H2 (3 мг/кг)	2,9	2,4	0,6	0,1

Таблица 20. Оценка трансплантата кожи для антител к CD40 (10 мг/кг)

	8 дней	10 дней	15 дней	20 дней
Контрольный образец	3	3	3	3
Модель	0,7	0	0	0
CFZ533 (10 мг/кг)	2,9	2,1	0	0
9E6-L4H2 (10 мг/кг)	3	2,7	0,3	0
2F12-L4H2 (10 мг/кг)	2,7	2,4	0,9	0,4

Кроме того, как показано на фиг. 7 и в таблицах 21-23, 9E6-L4H2 и 2F12-L4H2 дополнительно усиливали устойчивость к отторжению трансплантата кожи мыши после применения в комбинации с такролимусом.

Таблица 21. Показатели выживаемости трансплантата кожи в день 15 для антител к CD40 в комбинации с такролимусом

	Коэффициент выживаемости трансплантата кожи (%)		Коэффициент выживаемости трансплантата кожи (%)
Контрольный образец	100%	Контрольный образец	100%
Модель	0%	Модель	0%
FK506 (3 мг/кг)	16,7%	FK506 (3 мг/кг)	16,7%
9E6-L4H2 (10 мг/кг)	14,3%	2F12-L4H2 (10 мг/кг)	42,9%
9E6-L4H2 (10 мг/кг) +FK506	33,3%	2F12-L4H2 (10 мг/кг) +FK506	83,3%

Таблица 22. Оценки кожных трансплантатов для антител к CD40 в комбинации с такролимусом

	8 дней	10 дней	15 дней	20 дней
Контрольный образец	3	3	3	3
Модель	0,7	0	0	0
FK506 (3 мг/кг)	2,5	1,5	0,5	0
9E6-L4H2 (10 мг/кг)	3	2,7	0,3	0
9E6-L4H2 (10 мг/кг) + FK506(3 мг/кг)	2,3	1,5	0,7	0,7

Таблица 23. Оценки кожных трансплантатов для антител к CD40 в комбинации с такролимусом

	8 дней	10 дней	15 дней	20 дней
Контрольный образец	3	3	3	3

Модель	0,7	0	0	0
FK506 (3 мг/кг)	2,5	1,5	0,5	0
2F12-L4H2 (10 мг/кг)	2,7	2,4	0,9	0,4
2f12-L4H2 (10 мг/кг) + FK506 (3 мг/кг)	2,7	2,3	1,5	0,8

Пример 14. ПК анализы гуманизированных антител к CD40 у трансгенных мышей CD40 человека

Самки трансгенных мышей CD40 человека в возрасте 6-7 недель были приобретены у Biocytogen Jiangsu Co., Ltd. Условия содержания: SPF (свободный от специфических патогенов); лицензия на производство: SCXK (Цзянсу)-2016-0004; номер сертификации трансгенной мыши CD40 человека: 320726200100154632. После прибытия животных акклиматизировали в течение 7 дней и случайным образом группировали. В день 0 эксперимента каждой группе мышей внутрибрюшинно вводили антитело к CD40 в дозе 10 мг/кг. Образцы крови объемом 100-150 мкл собирали через 15 мин, 4 ч и 8 ч после введения и в дни 1, 2, 4, 7, 10 и 14 после введения, антикоагулировали 10 мкл EDTA-K2 (0,1 М) и хранили на льду. Плазму мыши анализировали с помощью ELISA на концентрацию антител в разные моменты времени. Анализ, в частности, выглядит следующим образом: козье антитело против Fc IgG человека (Rockland, кат. № 609-101-017) разбавляли до 2,5 мкг/мл PBS и добавляли в 96-луночный планшет при 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали в течение ночи при 4 °C. После трех промывок промывочным буфером в каждую лунку добавляли 50 мкл блокирующего раствора и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Добавляли плазму мыши и стандартную кривую тестируемого антитела, и планшет инкубировали при 37 °C в течение 2 часов. После трех промывок промывочным буфером анти-hlgG Fab-HRP (Sigma, кат. № A0293, 1:10 000) добавляли при 50 мкл/лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшет трижды промывали промывочным буфером. ТМВ добавляли при 100 мкл/лунку, и смеси оставляли реагировать в темноте в течение 5 мин. Добавляли 0,16 М серную кислоту при 100 мкл/лунку. Значение OD (оптическая плотность) при 450 нм измеряли с помощью микропланшетного ридера Envision и рассчитывали концентрации антагонистических антител к CD40.

Согласно результатам, представленным в таблице 24 и на фиг. 8, 9E6-L4H2, 2F12-L4H2 и контрольная молекула CFZ533 имеют сходные ПК характеристики у трансгенных

мышей CD40 человека.

Таблица 24. Фармакокинетические данные для антагонистических антител к CD40 у трансгенных мышей hCD40

	CFZ533	9E6-L4H2	2F12-L4H2
T _{1/2} (ч) (период полувыведения)	214,8	226,8	257,1
C _{max} (мг/л)	75,95	85,8	88,78
AUC(0-д14)((ч)*(мг/л)) (площадь под кривой «концентрация-время» от введения дозы (время 0) до момента измерения концентрации на 14 день).	12655	13439	12014

Пример 15. Анализы аффинности гуманизированных антител к CD40 к FcRn человека

Тестируемое антитело захватывали с аффинностью на чипе Fab против человека, и серии концентраций антигена FcRn человека (приобретенного у AcroBiosystem) позволяли течь по поверхности чипа. Сигналы реакции, когда реакции находились в равновесном состоянии, были обнаружены в режиме реального времени с использованием прибора Biacore. Буфер, используемый в эксперименте, представлял собой буферный раствор HBS-EP + 10× (кат. № BR-1006-69, GE), разбавленный до 1× (pH 7,4) деионизированной водой. Подгонку проводили на данных, полученных в эксперименте, с использованием модели стационарного связывания для получения значений аффинности. См. Таблицу 25. Антитела к CD40, несущие мутацию AAYTE, имеют более высокую аффинность связывания с FcRn человека, чем их исходные антитела.

Таблица 25. Анализы аффинности гуманизированных антител к CD40 к FcRn человека

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	K_D (M)
FcRn человека	2F12-L4H2	2,79E-07
	2F12-L4H2-AAYTE	4,42E-08
	9E6-L4H2	2,93E-07
	9E6-L4H2-AAYTE	3,98E-08

Пример 16. Ингибирующая активность антител к CD40, несущих мутацию AAYTE в Fc в системе анализа активации В-клеток

Со ссылкой на способ в Примере 10 измеряли ингибирующую активность антител 2F12-L4H2-AAYTE и 9E6-L4H2-AAYTE к CD40, которые несут мутацию AAYTE в Fc, в системе анализа активации В-клеток. Согласно результатам, показанным на фиг. 9A-9B, антитела к CD40 с мутацией Fc обладают аналогичной активностью ингибирования В-клеток по сравнению с их исходными антителами к CD40.

Пример 17. Ингибирующая активность антител к CD40, несущих мутацию AAYTE в Fc в системе анализа активации DC клеток

Со ссылкой на способ в Примере 11 измеряли ингибирующую активность антител 2F12-L4H2-AAYTE и 9E6-L4H2-AAYTE к CD40, которые несут мутацию AAYTE в Fc, в системе анализа активации DC клеток. Согласно результатам, показанным на фиг. 10A-10D, антитела к CD40 с мутацией Fc обладают аналогичной активностью ингибирования клеток DC по сравнению с их исходными антителами к CD40.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где:

a-1) VH содержит HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в любой из SEQ ID NO: 67 и 68, и VL содержит LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи), LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 63-66;

a-2) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 1, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 2;

a-3) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 3, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 4;

a-4) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 5, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 6;

b-1) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в любой из SEQ ID NO: 81 и 82, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в любой из SEQ ID NO: 77-80;

b-2) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 7, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 8;

b-3) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 9, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 10;

b-4) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 11, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 12;

b-5) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 13, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 14;

b-6) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 15, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 16;

b-7) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 17, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 18;

c) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 19, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 20; или

d) VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в VH, представленной в SEQ ID NO: 21, и VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в VL, представленной в SEQ ID NO: 22;

где CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, IMGT, Чотиа, AbM или Contact, предпочтительно со схемой нумерации по Кабату.

2. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее:

1) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно;

2) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 88, 89 и 90, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 91, 37 и 92, соответственно;

3) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно; или

4) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 60, 61 и 62, соответственно;

где предпочтительно антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент в 1) содержит:

1-1) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 29, 30 и 73, соответственно;

1-2) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 26, 27 и 28, соответственно; или

1-3) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 29, 27 и 32, соответственно;

предпочтительно антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент в 2)

содержит:

2-1) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 49, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 87, 50 и 48, соответственно;

2-2) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 33, 34 и 35, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36, 37 и 38, соответственно;

2-3) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 42, 37 и 43, соответственно;

2-4) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 44 и 35, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 45, 37 и 46, соответственно; или

2-5) HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 41, соответственно; и LCDR1 легкой цепи, LCDR2 легкой цепи и LCDR3 легкой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 36, 37 и 48, соответственно;

более предпочтительно антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент в 1-1) содержит:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25, соответственно; LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30; и LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 69-72;

более предпочтительно антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент в

2-1) содержит:

HCDR1 тяжелой цепи, HCDR2 тяжелой цепи и HCDR3 тяжелой цепи, содержащие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 47 и 49, соответственно; LCDR1 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 83-86; LCDR2 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; и LCDR3 легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

3. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, представляющее собой рекомбинантное антитело, кроличье антитело, химерное антитело, гуманизованное антитело, полностью человеческое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.

4. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где:

для гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента каркасные области тяжелой цепи получены из IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02, IGHV4-4*08 и IGHI1*01, и/или каркасные области легкой цепи получены из IGkV1-13*02, IGkV1-9*01, IGkV1-6*01 и IGKJ4*01;

предпочтительно, каркасные области FR1-FR3 тяжелой цепи получены из IGHV2-26*01, IGHV4-30-4*02 или IGHV4-4*08, и каркасная область FR4 тяжелой цепи получена из IGHI1*01; каркасные области FR1-FR3 легкой цепи получены из IGkV1-13*02, IGkV1-9*01 или IGkV1-6*01, и каркасная область FR4 легкой цепи получена из IGKJ4*01.

5. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где:

A-1) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 67 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 63-66 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-2) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 68 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 63-66 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-3) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 2 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-4) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 3 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 4 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

A-5) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 5 или по

меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 6 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-1) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 81 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 77-80 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-2) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 82 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в любой из SEQ ID NO: 77-80 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-3) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 7 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 8 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-4) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 9 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 10 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-5) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 12 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-6) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 13 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 14 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-7) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 15 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 16 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

B-8) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 17 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 18 или по меньшей мере на 90% идентична ей;

C) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 19 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 20 или по меньшей мере на 90% идентична ей; или

D) аминокислотная последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 21 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и аминокислотная последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 22 или по меньшей мере на 90% идентична ей.

6. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащее Fc-область антитела IgG, где предпочтительно антитело IgG представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4; более предпочтительно Fc-область

представляет собой Fc-область IgG1, содержащую мутацию N297A, или Fc-область IgG1, содержащую любую одну или более из мутаций L234A, L235A, M252Y, S254T и T256E.

7. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент scFv, Fv, Fab или Fab'.

8. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, где:

полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 93 или 97 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 94 или по меньшей мере на 90% идентична ей; или

полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 95 или 98 или по меньшей мере на 90% идентична ей, и полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 96 или по меньшей мере на 90% идентична ей.

9. Антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, характеризующееся по меньшей мере одним из следующего:

- i) связывание с CD40 человека с K_D , равной 10 нМ или менее; и
- ii) отсутствие значительной агонистической активности.

10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

11. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 10.

12. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 10 или вектор по п. 11.

13. CD40-связывающая молекула, содержащая антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

15. Фармацевтическая композиция по п. 14, дополнительно содержащая такролимус.

16. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 14, где

аутоиммунное заболевание предпочтительно представляет собой синдром Шегрена, рассеянный склероз или системную красную волчанку и более предпочтительно системную красную волчанку.

17. Применение антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 для получения лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания, где

аутоиммунное заболевание предпочтительно представляет собой синдром Шегрена, рассеянный склероз или системную красную волчанку и более предпочтительно системную красную волчанку.

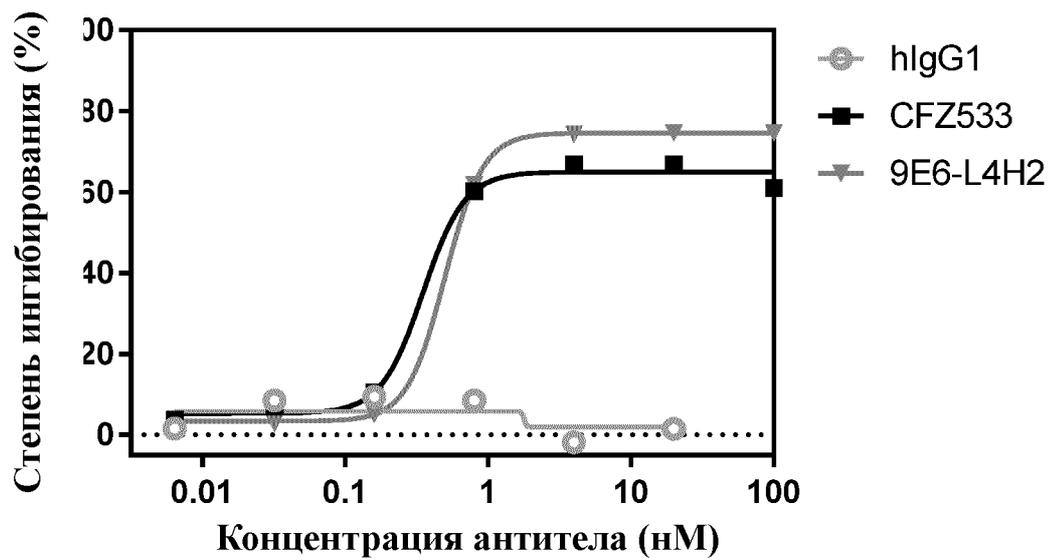
18. Способ лечения заболевания "трансплантат против хозяина" или уменьшения отторжения трансплантата, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 14 или 15, где

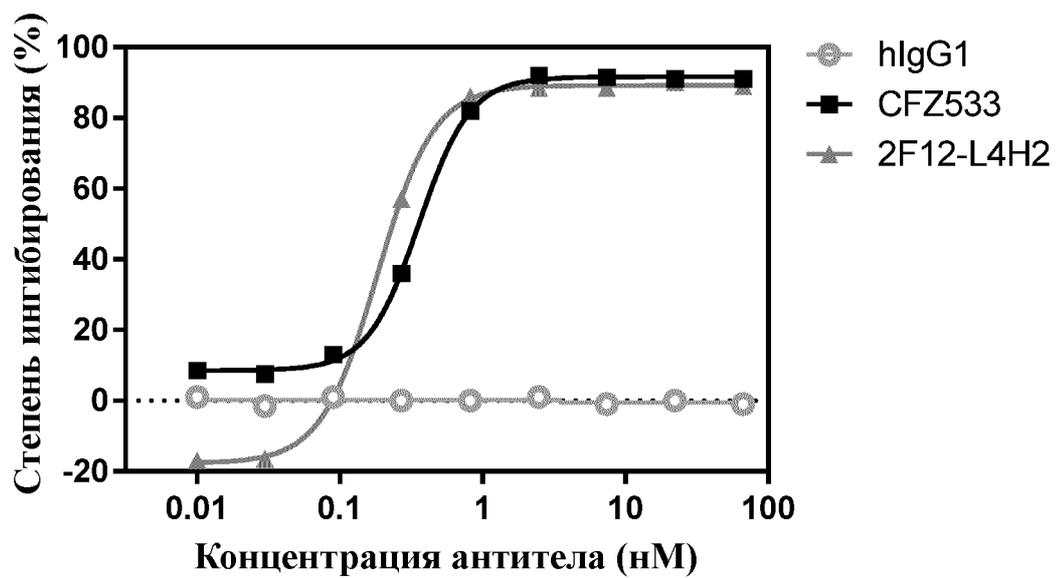
трансплантат предпочтительно представляет собой трансплантат солидного органа и более предпочтительно представляет собой трансплантат печени, почки, сердца или легкого.

19. Применение антитела к CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 в комбинации с такролимусом для получения лекарственного средства для лечения заболевания "трансплантат против хозяина" или уменьшения отторжения трансплантата, где

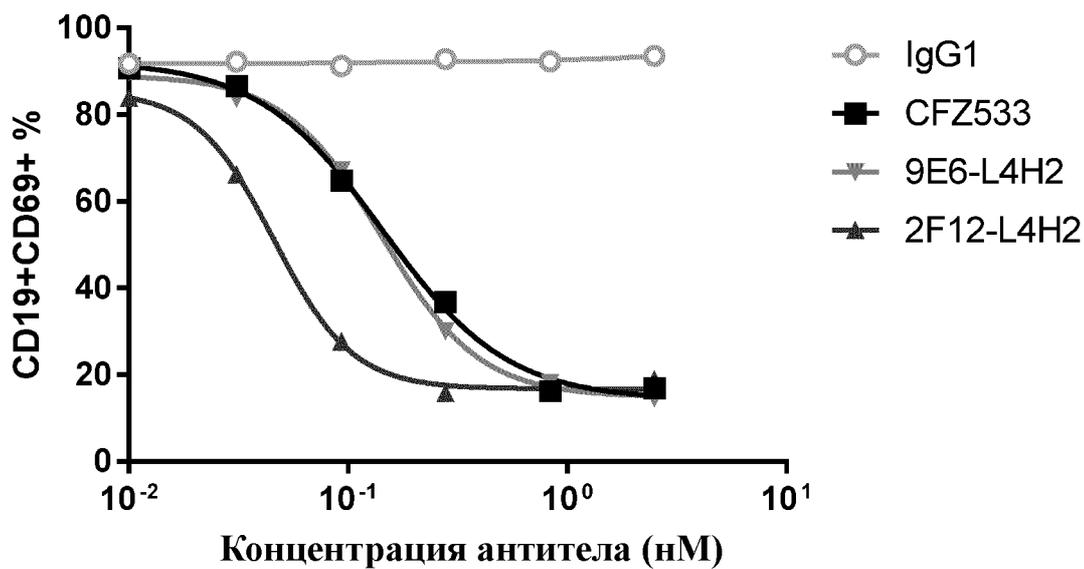
трансплантат предпочтительно представляет собой трансплантат солидного органа и более предпочтительно представляет собой трансплантат печени, почки, сердца или легкого.



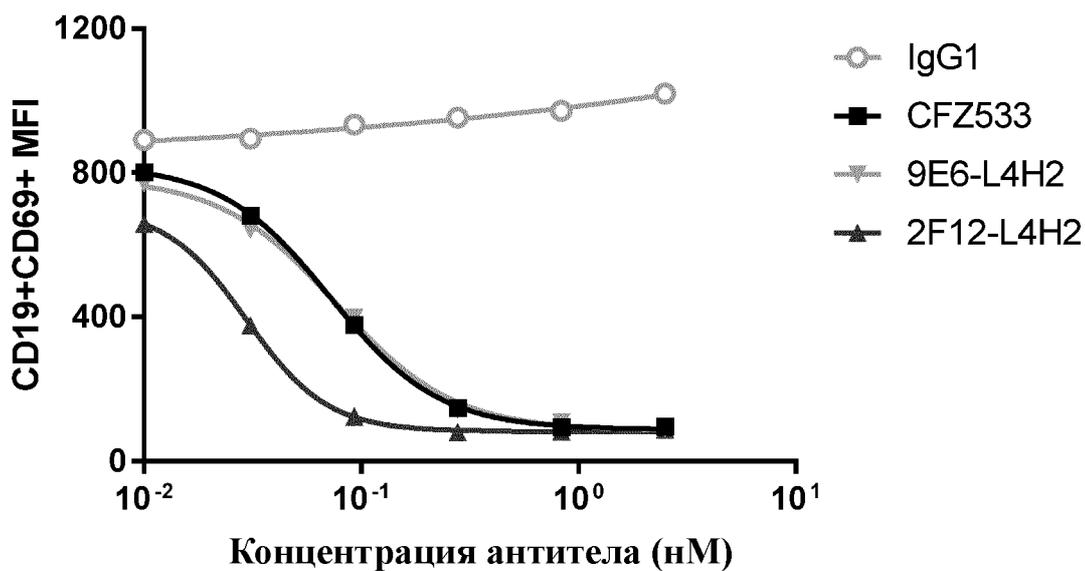
ФИГ. 1А



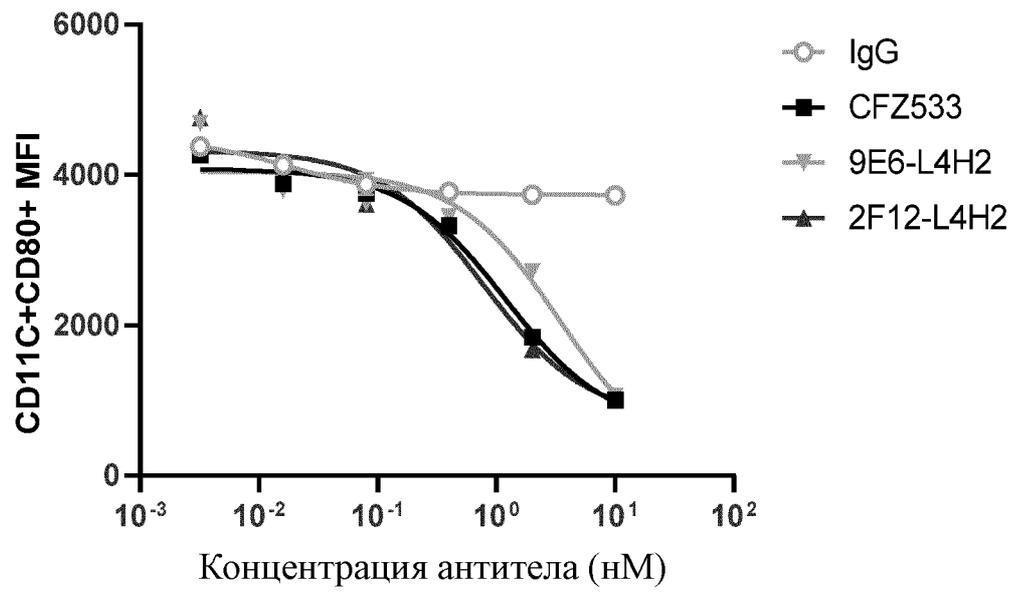
ФИГ. 1В



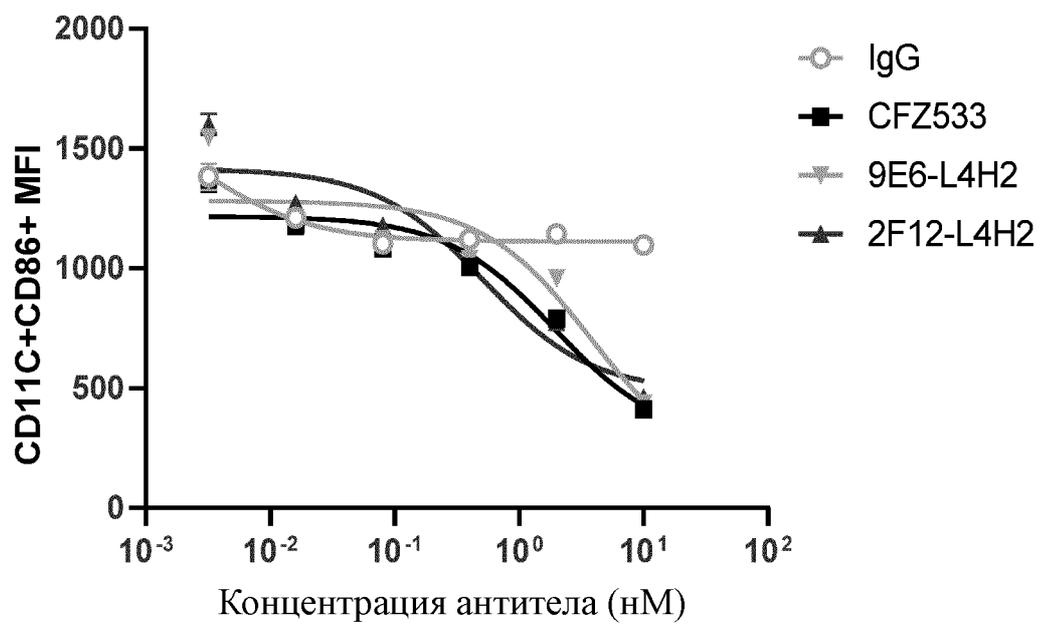
ФИГ. 2А



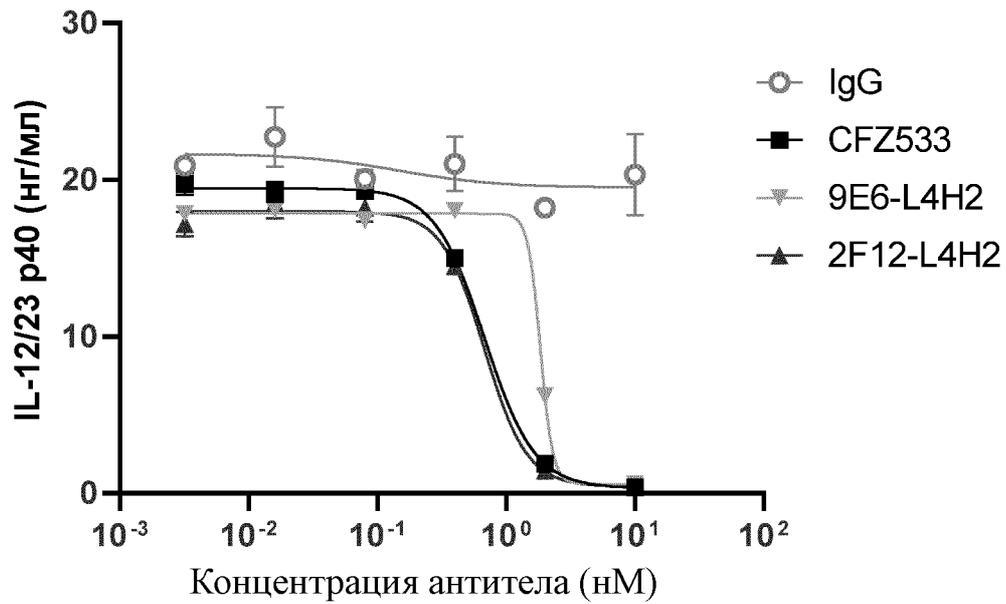
ФИГ. 2В



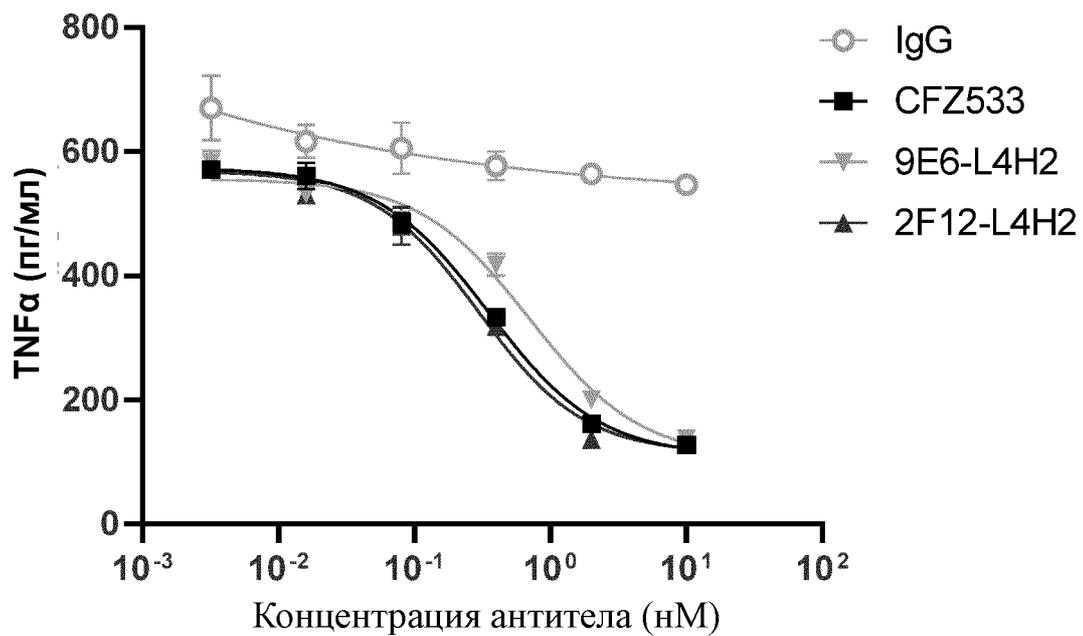
ФИГ. 3А



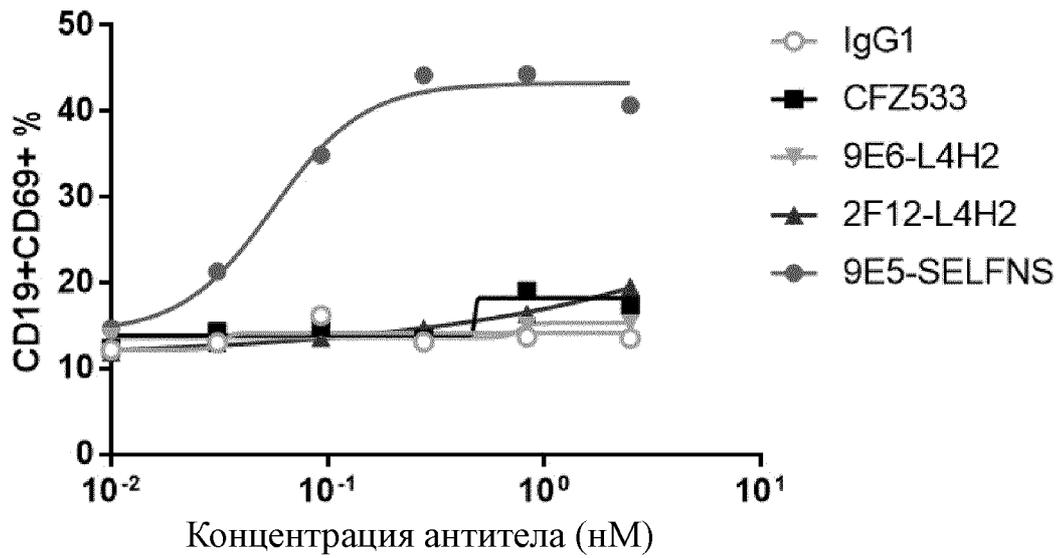
ФИГ. 3В



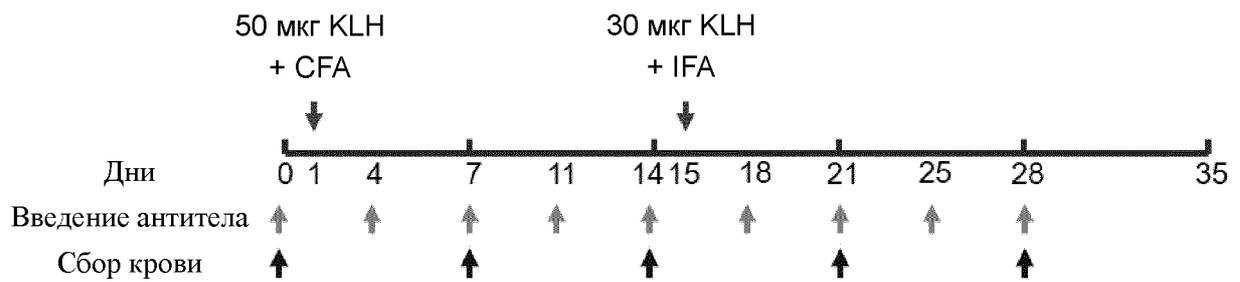
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D



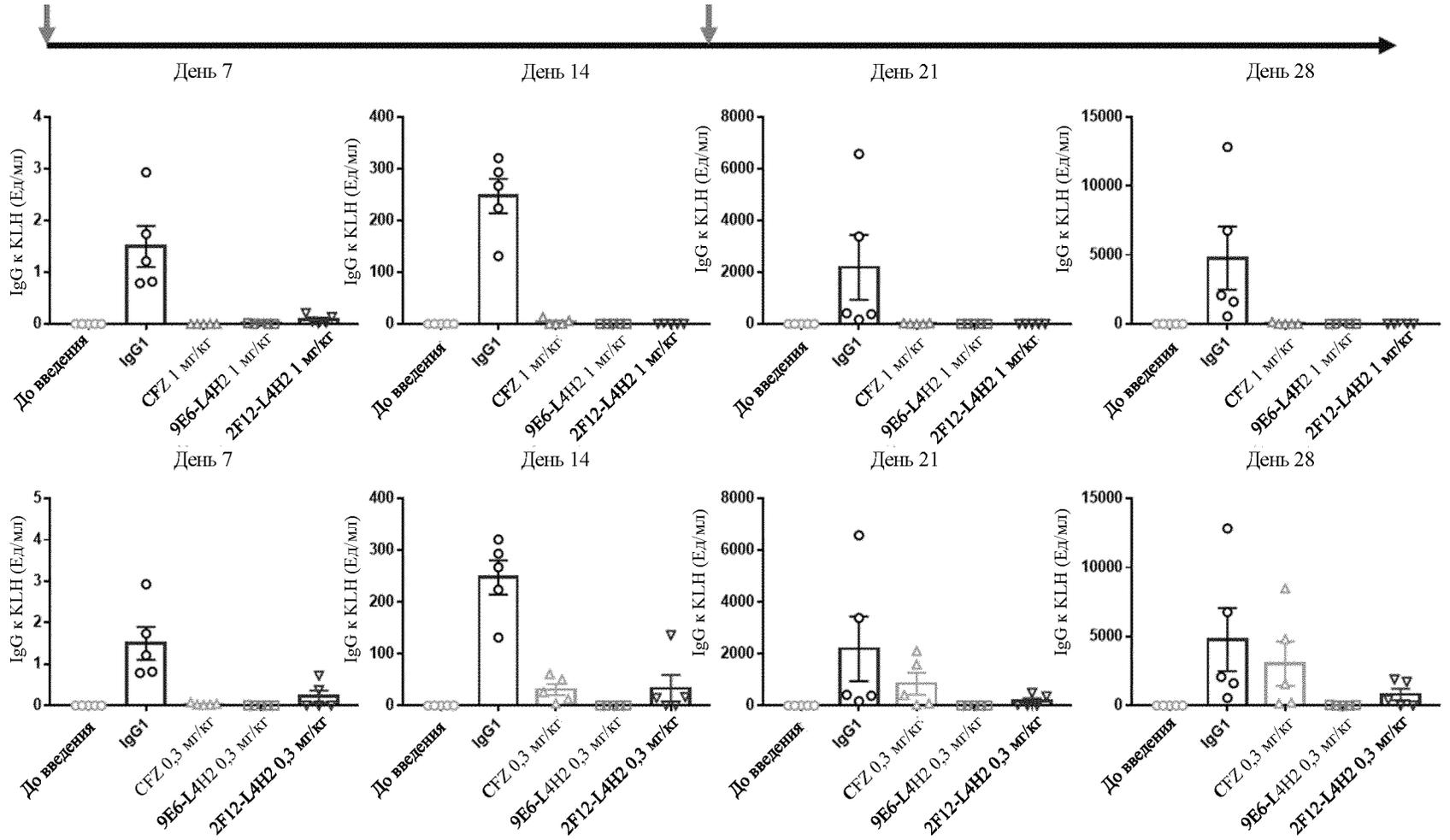
ФИГ. 4



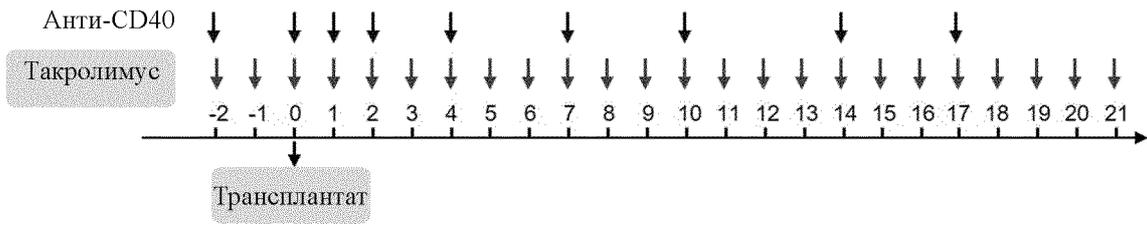
ФИГ. 5А

Первая иммунизация

Вторая иммунизация

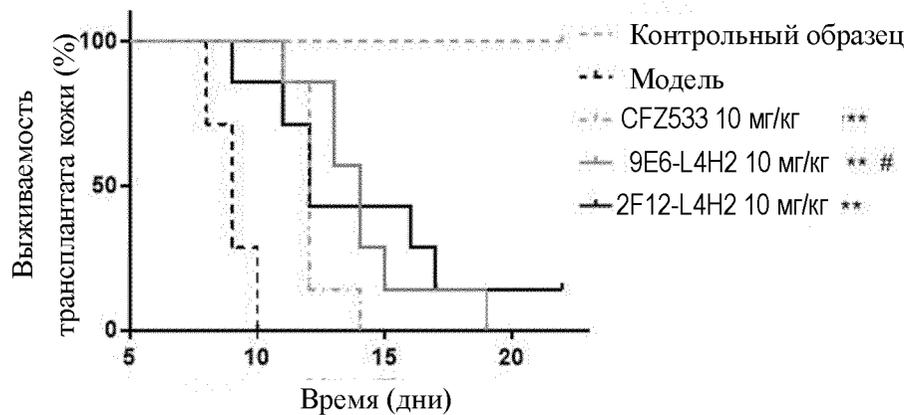
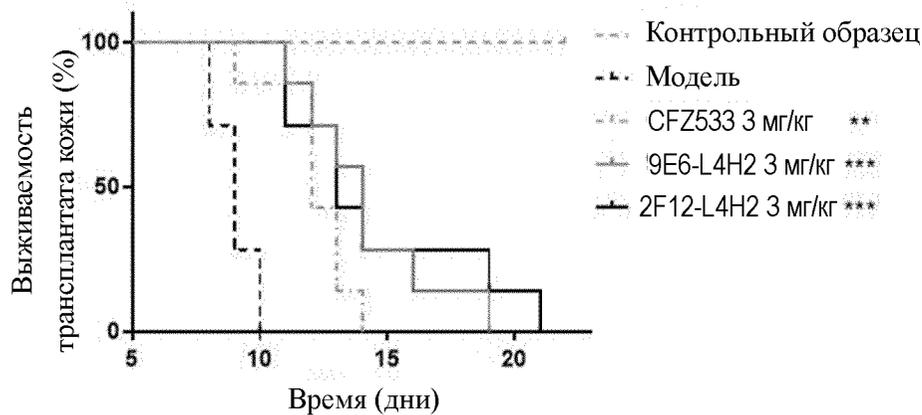


ФИГ. 5В



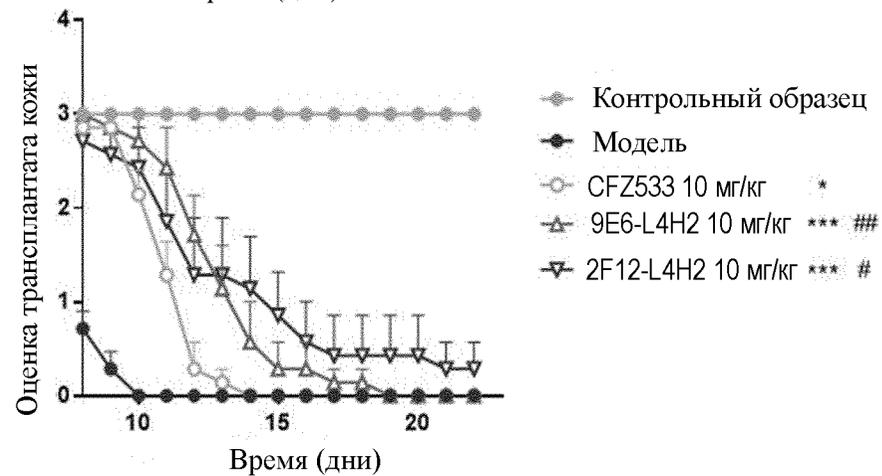
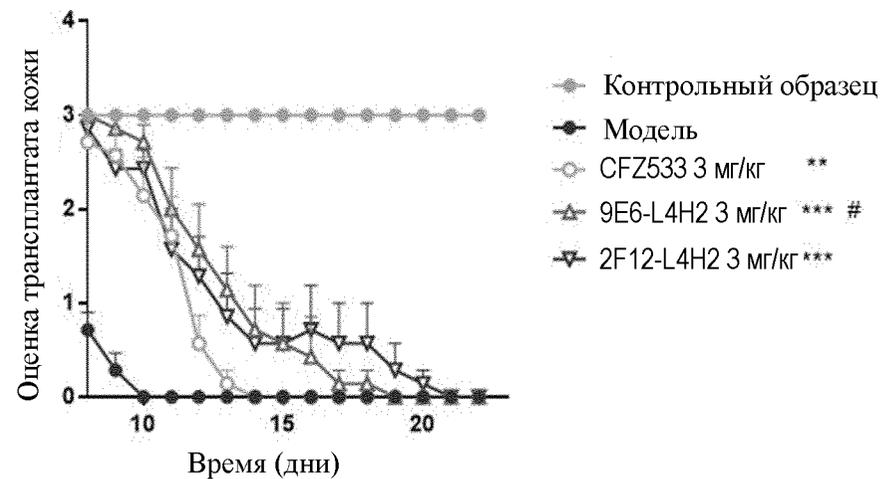
ФИГ. 6А

Выживаемость трансплантата кожи (%)



*по сравн. с моделью
по сравн. с CFZ533

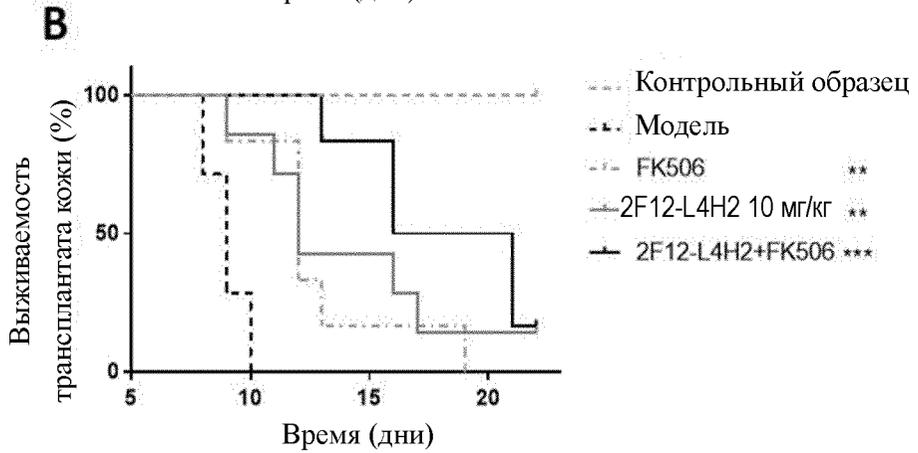
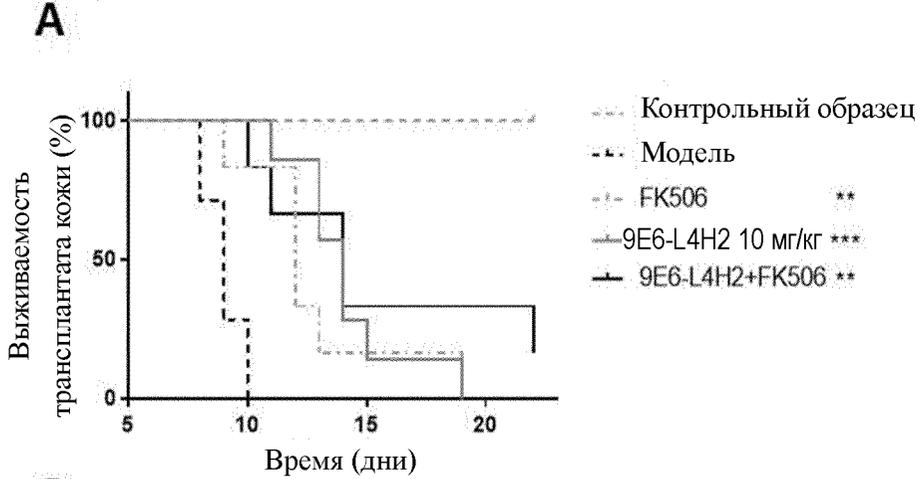
Оценка трансплантата кожи



*по сравн. с моделью
по сравн. с CFZ533

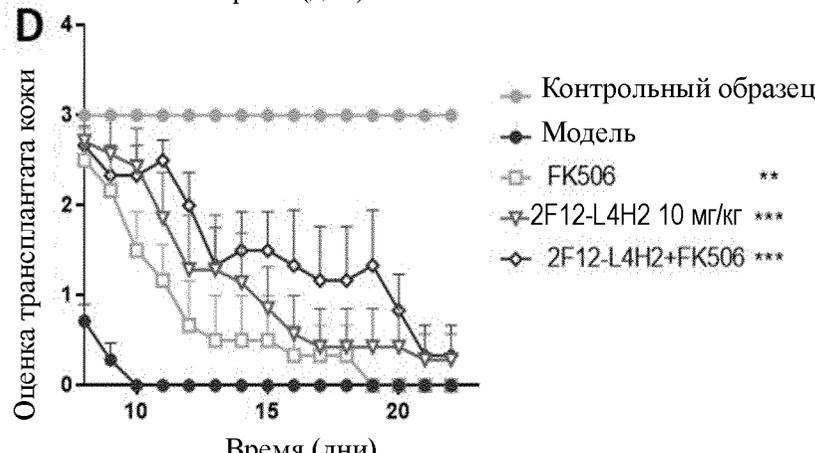
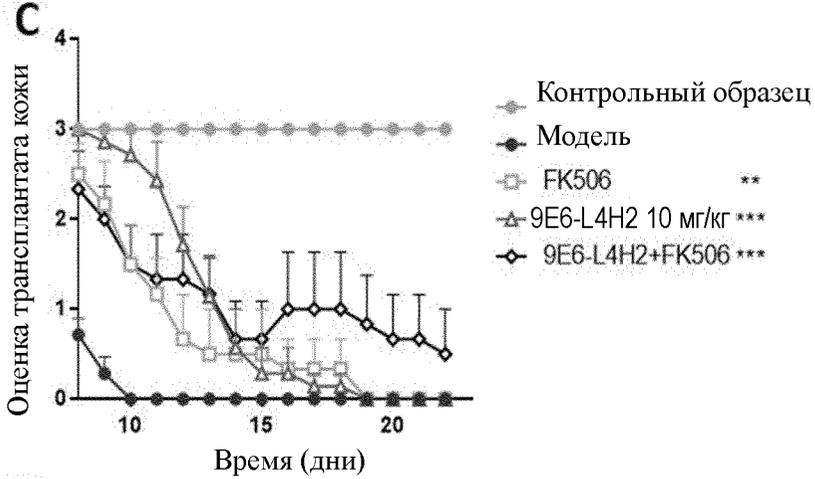
ФИГ. 6В

Выживаемость трансплантата кожи (%)



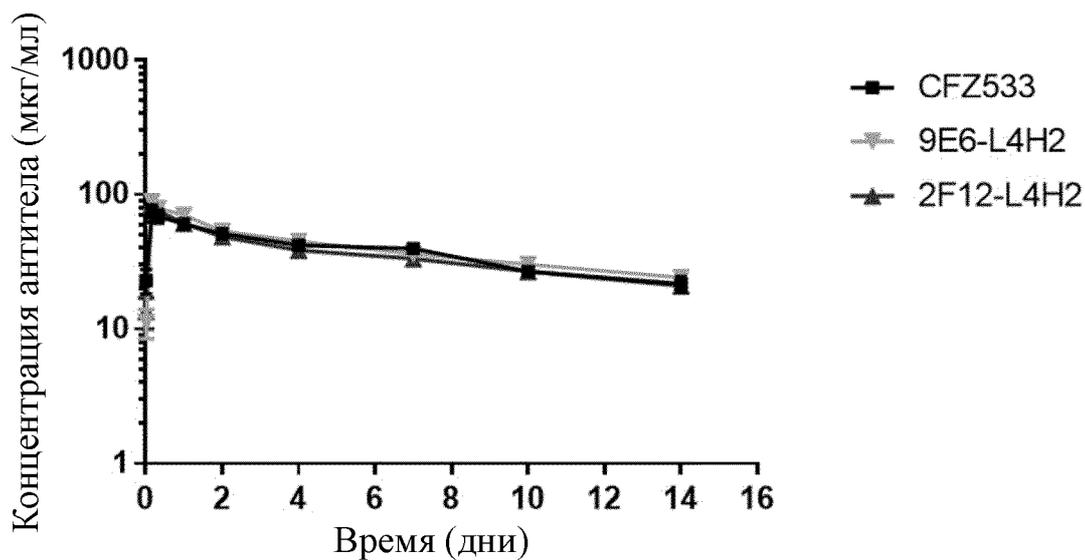
*по сравн. с моделью

Оценка трансплантата кожи

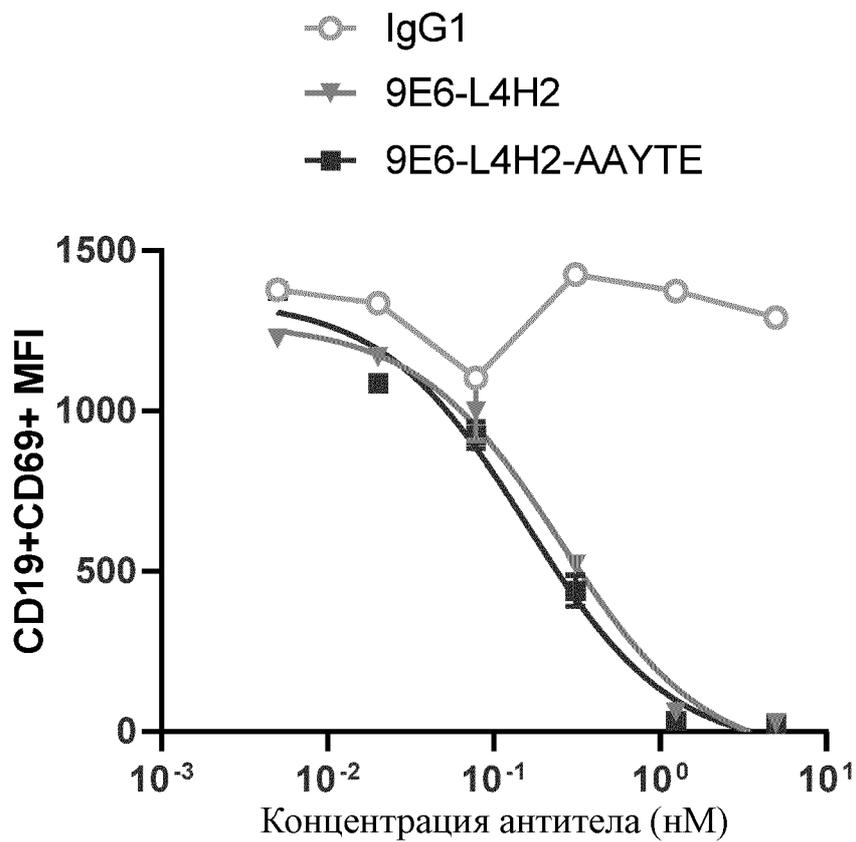


*по сравн. с моделью

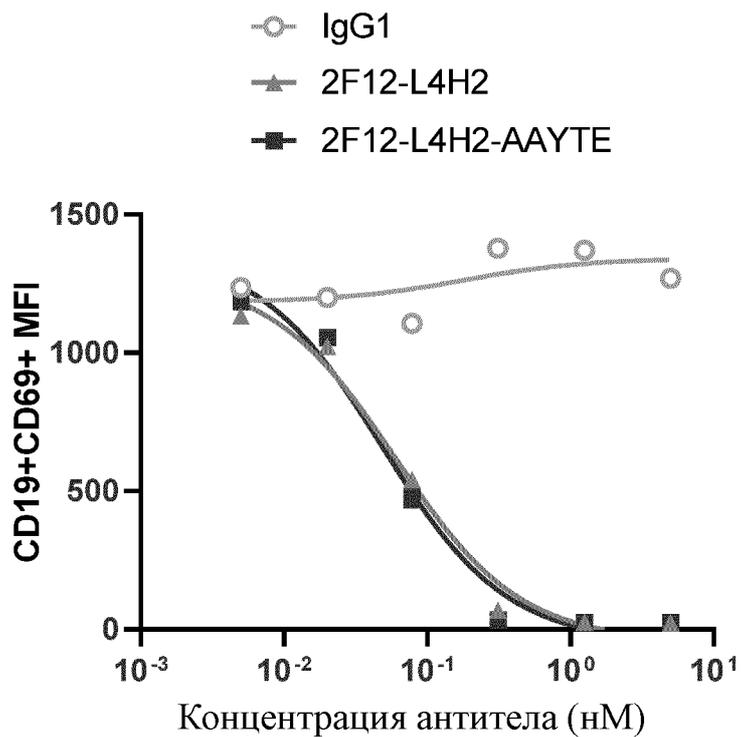
ФИГ. 7



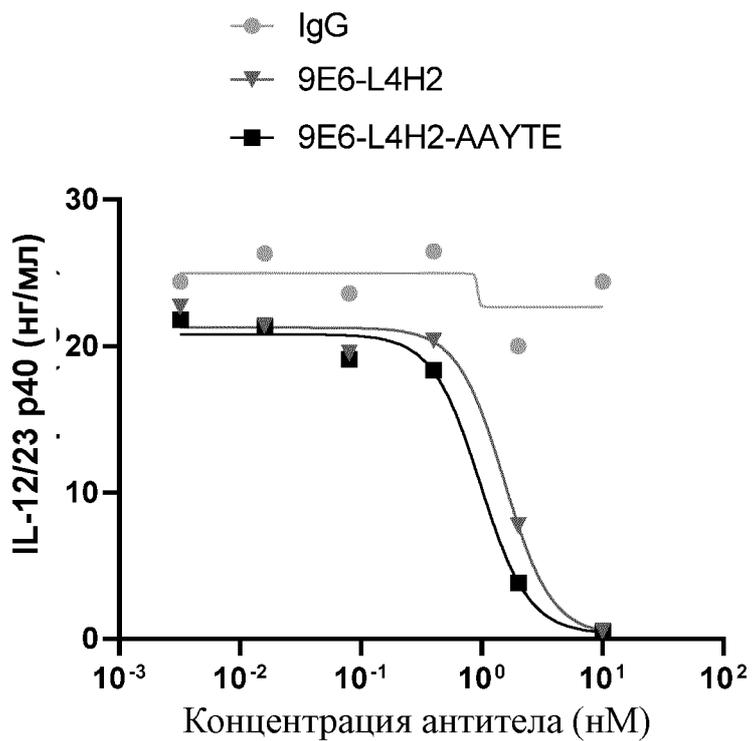
ФИГ. 8



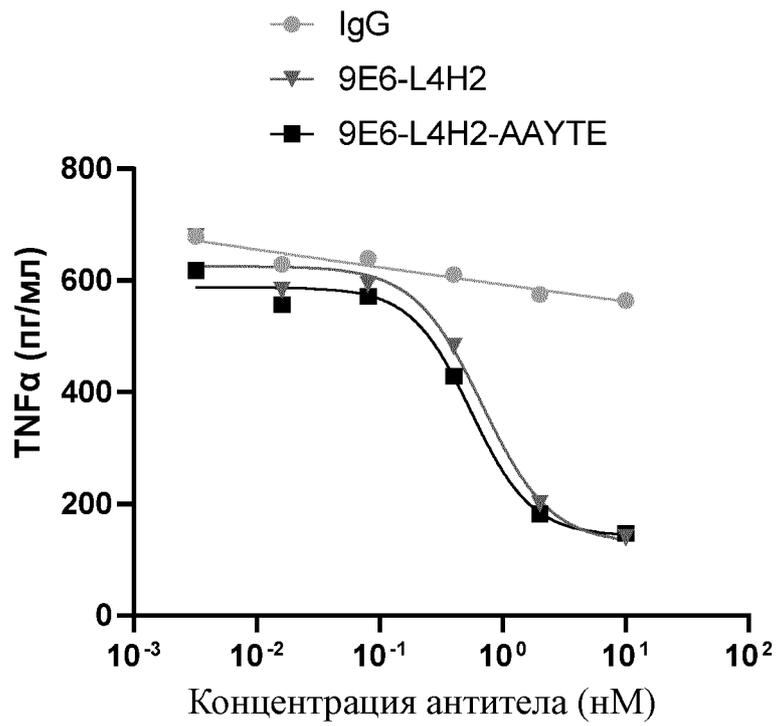
ФИГ. 9А



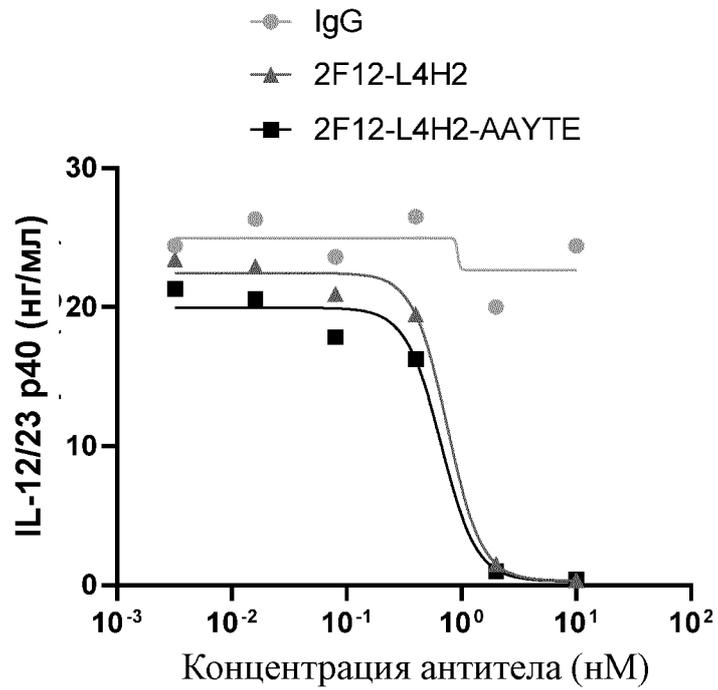
ФИГ. 9В



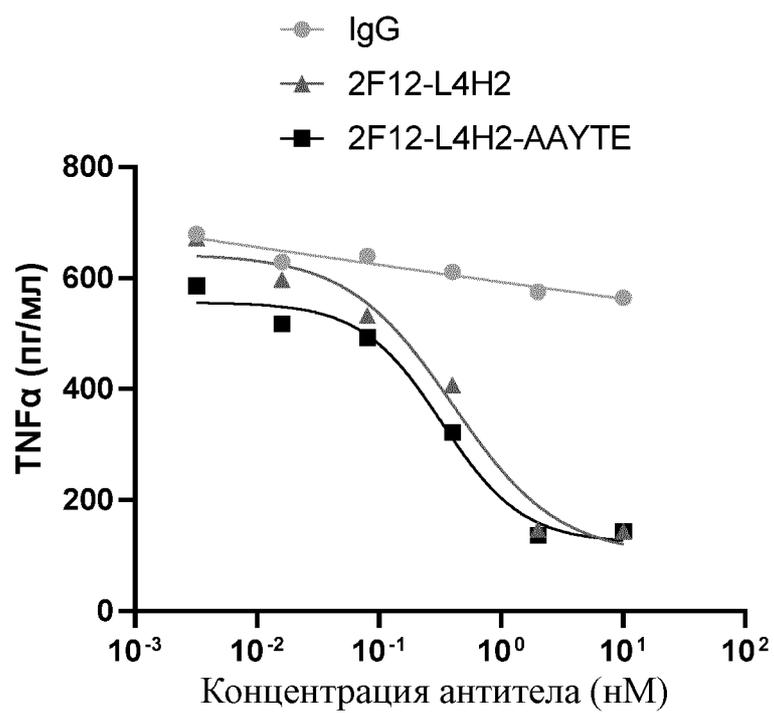
ФИГ. 10А



ФИГ. 10В



ФИГ. 10С



ФИГ. 10D