

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490164** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.05.22

(22) Дата подачи заявки
2022.08.24

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **МОЛЕКУЛА, СВЯЗЫВАЮЩАЯ FAP/CD40, И ЕЕ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202110973560.5**

(32) **2021.08.24**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/114522**

(87) **WO 2023/025194 2023.03.02**

(71) Заявитель:

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

(72) Изобретатель:

**Линь Юань, Чэнь Сымэн, У Тинтин,
Ху Жунтин, Ляо Чэн (CN)**

(74) Представитель:

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

(57) Молекула, связывающая FAP/CD40, и ее медицинское применение. В частности, предложены молекула, связывающая FAP, молекула, связывающая CD40, и молекула, связывающая FAP/CD40, способ предотвращения и лечения заболеваний (таких как опухоли или злокачественные новообразования) с их использованием и их медицинское применение.

A1

202490164

202490164

A1

МОЛЕКУЛА, СВЯЗЫВАЮЩАЯ FAP/CD40, И ЕЕ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящее изобретение испрашивает приоритет по патентной заявке Китая (заявка № CN202110973560.5), поданной 24 августа 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 молекуле, связывающей FAP/CD40, ее фармацевтической композиции, способу лечения заболевания, в частности, опухолей или рака, с ее применением и связанному с ней фармацевтическому применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD40 (TNFRSF5), трансмембранный фосфорилированный гликопротеин, является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRS). CD40 экспрессируется во многих типах клеток, включая В-клетки, фолликулярные дендритные клетки (DC), эпителиальные клетки, моноциты, макрофаги, гладкомышечные клетки и опухолевые клетки. Его лиганд CD40L в основном экспрессируется в активированных Т-клетках, активированных В-клетках, тромбоцитах, гладкомышечных клетках и т. д. Связывание CD40L мультимеризует CD40, генерируя нисходящие сигналы активации, роста и дифференцировки. Передача сигналов CD40 активирует различные нисходящие сигнальные пути, такие как NF-κB, MAPK и STAT3 (Pupe S, et al. J Biol Chem. 2000 Jun. 16; 275(24): 1858693), и эти пути регулируют экспрессию генов путем регуляции белков активации c-Jun и ATF2 и фактора транскрипции Rel. Связывание CD40 с CD40L индуцирует пролиферацию покоящихся В-клеток, переключение иммуноглобулинов и секрецию антител и играет важную роль в развитии зародышевых центров в тканях и выживании В-клеток. Все они необходимы для гуморальных иммунных ответов (Kehry M R. J Immunol 1996; 156:2345-2348). Связывание CD40L с CD40 на DC индуцирует созревание DC. Это проявляется в повышенной экспрессии семейства костимулирующих факторов B7 (CD80, CD86) и повышенной секреции провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 12 (IL-12). Взаимодействие между CD40 и CD40L обеспечивает костимулирующий сигнал для активации Т-клеток и способствует представлению антигенов Т-клеткам DC-клетками.

С клиническим успехом терапии ингибиторами иммунных контрольных точек (ICI),

нацеленной на CD40, CTLA-4 и PD-L1 при лечении опухолей, иммунотерапия стала наиболее ожидаемой областью исследований среди терапии опухолей третьего поколения. Было показано, что противоопухолевая иммунотерапия, основанная на механизме, согласно которому презентация антигена DC-клетками и активация T-клеток повышаются за счет активации CD40, является клинически эффективной. Однако существует системная активация CD40, которая может приводить к некоторым специфическим для мишени токсичностям, таким как цитокиновые штормы, гепатотоксичность, гематологическая токсичность и венозный тромбоз, вызванные периферической активацией CD40. Эти токсичности ограничивают терапевтические окна антител-агонистов CD40. Клинические исследования агонистов CD40 CP-870 и 893 компании Pfizer и слитого белка CD40L-Fc компании Medimmune MEDI5083 (новый слитый белок компании AstraZeneca, который активирует сигнальный путь CD40, состоящий из 3 молекул CD40L, соединенных в тандем, и IgG4-Fc) были прекращены. Таким образом, при исследовании и разработке антител-агонистов CD40 второго поколения исследователи стремятся опосредовать активацию CD40 через опухолеассоциированные антигены (ТАА), так что CD40 специфически активируется в опухолях, в то время как периферическая активация CD40 снижается, тем самым увеличивая терапевтические окна антител-агонистов CD40.

Белок активации фибробластов (FAP) α представляет собой опухолеассоциированный антиген. FAP слабо экспрессируется в нормальных тканях здоровых взрослых и селективно экспрессируется в 93% опухолевых тканей, при этом 30% представляет собой высокую экспрессию, такую как рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак желудка, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря и плоскоклеточная карцинома полости рта. Настоящее изобретение относится к антителу к FAP, антителу к CD40 и биспецифическому антителу к обоим. Биспецифическое антитело может опосредовать опухолеспецифическую активацию CD40 посредством FAP, оказывать предсозревающее и активационное действие на APC (антигенпрезентирующие клетки) (например, дендритные клетки (DC)), может устранять гепатотоксичность, токсичность периферической крови и другие периферические токсичности и иметь отличное окно введения и отличную лекарственную способность, тем самым обеспечивая решение для клинического применения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложена молекула, связывающая CD40, молекула, связывающая FAP, и молекула, связывающая FAP/CD40 (например, биспецифическое антитело к FAP/CD40), с новыми структурами; кодирующие нуклеиновые кислоты,

векторы, клетки-хозяева и их фармацевтические композиции; способ лечения, облегчения или предотвращения клеточных пролиферативных заболеваний (например, опухолей или рака) с их применением; и связанное с ними фармацевтическое применение.

Молекула, связывающая CD40

В настоящем изобретении предложена молекула, связывающая CD40, содержащая по меньшей мере один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, и одиночный вариабельный домен иммуноглобулина содержит три области, определяющие комплементарность, CDR1 (CDR - область, определяющая комплементарность), CDR2, CDR3, где:

1) CDR1 в одиночном вариабельном домене иммуноглобулина содержит или представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и/или CDR2 содержит или представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и/или CDR3 содержит или представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41;

2) аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в одиночном вариабельном домене иммуноглобулина представлены в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно;

3) аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в одиночном вариабельном домене иммуноглобулина представлены в SEQ ID NO: 24, 25 и 26 или SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно;

4) аминокислотная последовательность в одиночном вариабельном домене иммуноглобулина содержит или представлена в любой из SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38 или по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38; и/или

5) CDR1, CDR2 и CDR3 в одиночном вариабельном домене иммуноглобулина представляют собой CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 22, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 23, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 32, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 33, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 34, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 35, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 36, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 37, или CDR1, CDR2 и CDR3 в SEQ ID NO: 38; CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, IMGT, Чотиа, AbM или Contact; в некоторых конкретных вариантах осуществления CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложена молекула, связывающая CD40, содержащая любой один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) из вышеупомянутых одиночных вариабельных доменов иммуноглобулина, и одиночные

вариабельные домены иммуноглобулина могут быть идентичными или различными.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутые одиночные вариабельные домены иммуноглобулина представляют собой наноантитела или VHH.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина человека. В некоторых конкретных вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых конкретных вариантах осуществления Fc-область IgG1 человека имеет мутацию, которая увеличивает аффинность к FcγRIIb или уменьшает эффекты ADCC, например, S267E/L328F. Типичными мутациями, которые уменьшают эффекты ADCC, являются L234A/L235A в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S в IgG4. Также может быть использован гибридный домен IgG2/4Fc, например, Fc с остатками 117-260 из IgG2 и остатками 261-447 из IgG4. Иллюстративные мутации, которые увеличивают аффинность к FcγRIIb, дополнительно включают E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R в IgG1.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая Fc-область может вызывать образование димерной или мультимерной молекулы антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления одиночный вариабельный домен иммуноглобулина в вышеупомянутой молекуле, связывающей CD40, связан с Fc-областью напрямую или с помощью линкера. Линкер может представлять собой нефункциональную аминокислотную последовательность из 1-20 или более аминокислот без вторичной или более высокой структуры. Например, линкер представляет собой гибкий линкер, например, G₄S, GS, GAP, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅ или ASGS.

В некоторых вариантах осуществления предложена молекула, связывающая CD40, содержащая любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 57-63, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, связана напрямую или косвенно, по меньшей мере с одним антителом, которое

связывается с другим антигеном, например, с образованием гетеродимера.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, обладает активностью, выбранной из по меньшей мере одной из следующих:

(a) связывания с CD40 человека или его эпитопом со значением K_D (равновесная константа диссоциации) $\leq 10^{-7}$ M;

(b) повышения или стимулирования активации и/или пролиферации APC (например, дендритных клеток (DC)); и

(c) ингибирования роста опухоли и/или метастазирования.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, ингибирует связывание CD40 с CD40L или конкурирует с CD40L за связывание с CD40.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутые молекулы, связывающие CD40, могут ингибировать рост опухоли и/или метастазирование по меньшей мере примерно на 10%, например, по меньшей мере примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70% или примерно на 80%.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40 снижает связывание CD40L 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 вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, связывается с CD40 человека с K_D 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M или ниже.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, представляет собой антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая CD40, представляет собой агонистическое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 представляет собой антитело верблюда, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 представляет собой наноантитело или VHH.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент включает, но не ограничивается ими, линейные антитела, одноцепочечные антитела, наноантитела, пептидные антитела, доменные антитела и мультиспецифические антитела (биспецифические антитела, диатела, триатела и тетраатела,

тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv).

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутое антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент охватывает варианты, например, содержит одну или более аминокислотных замен, например, консервативные аминокислотные замены, по сравнению с любой из SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38; например, варианты содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 консервативных аминокислотных замен.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, полученное путем созревания аффинности SEQ ID NO: 22 или 23, и антитело к CD40 с созревшей аффинностью может иметь в одной или более CDR одно или более изменений, которые приводят к повышению аффинности к CD40 по сравнению с исходным антителом к CD40.

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 его 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 его антигенсвязывающий фрагмент, связывание которого с CD40 (например, CD40 человека) блокируется вышеупомянутым антителом к CD40 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, содержащий вышеупомянутое антитело к CD40 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент.

В настоящем изобретении «по меньшей мере на 90% (последовательность) идентичная» охватывает по меньшей мере на 90%, 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%, по меньшей мере на 99% или на 100% (последовательность) идентичная; «по меньшей мере на 80% (последовательность) идентичная» охватывает по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, 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%, по меньшей мере на 99% или на 100% (последовательность) идентичная.

Молекула, связывающая FAP

Настоящее изобретение относится к молекуле, связывающей FAP, содержащей переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1 (CDR тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1 (CDR легкой цепи), LCDR2 и LCDR3, где:

1) аминокислотная последовательность HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 9, и/или аминокислотная последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 10, и/или аминокислотная последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 18; и/или аминокислотная последовательность LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 12, и/или аминокислотная последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 13, и/или аминокислотная последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 19;

2) аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 18, соответственно; и/или аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 19, соответственно;

3) аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно, и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; и аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно, аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 16, соответственно; или

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 17, соответственно;

4) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей; или

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

5) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 1, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 2;

переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 3, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 4;

переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 5, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 6; и или

переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в SEQ ID NO: 8, где CDR определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, IMGT, Чотиа, AbM или Contact, например, со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах осуществления предложена молекула, FAP-связывающая (например, антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент), содержащая любой из или комбинацию нескольких из вышеупомянутых HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP, дополнительно содержит Fc-область иммуноглобулина человека. В некоторых конкретных вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления Fc IgG1 человека имеет

мутацию, которая удаляет или уменьшает эффекторную функцию Fc, например, N297A или D265A/N297A на IgG1. Другие иллюстративные мутации, которые удаляют или уменьшают эффекторную функцию Fc, включают L234A/L235A, L234A/L235A/P329G, L234E, L234F, L234E/L235F или L234E/L235F/P329G в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A в IgG2 или IgG4, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1 и S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4.

В некоторых вариантах осуществления предложена молекула, связывающая FAP (например, антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент), содержащая тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), где:

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей; или

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи вышеупомянутой молекулы, связывающей FAP имеет от 0 до 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или

10) аминокислотных изменений; переменная 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 представляют собой консервативные замены, замещения или модификации и/или делеции или добавления, которые не влияют на функцию.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP, обладает активностью, выбранной из по меньшей мере одной из следующих:

- (a) связывания с FAP человека или его эпитопом со значением $K_D \leq 10^{-7}$;
- (b) повышения или стимулирования активации и/или пролиферации APC (например, дендритных клеток (DC)); и
- (c) ингибирования роста опухоли и/или метастазирования.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP, связывается с FAP (например, FAP человека) или его фрагментом с K_D 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M или менее.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP, представляет собой антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент; в некоторых конкретных вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP, представляет собой химерное антитело, гуманизованное антитело или полностью человеческое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент вышеупомянутого антитела к FAP включает, но не ограничивается ими, Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, линейные антитела, одноцепочечные антитела, scFv, sdAb, sdFv, наноантитела, пептидные антитела, доменные антитела и полиспецифические антитела (биспецифические антитела, диаантитела, триантитела и тетраантитела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv) и представляет собой, например, scFv, Fv, Fab или Fab' фрагмент.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, содержащий вышеупомянутое антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент.

Молекула, связывающая FAP/CD40

В настоящем изобретении предложена молекула, связывающая FAP/CD40, содержащая первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, где второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, содержит по меньшей мере один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления молекула, связывающая FAP/CD40, содержит один одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, который специфически связывается с CD40. В некоторых других вариантах осуществления молекула, связывающая FAP/CD40, содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более одиночных вариабельных доменов иммуноглобулина, которые специфически связываются с CD40, и одиночные вариабельные домены иммуноглобулина могут быть идентичными или различными.

В некоторых вариантах осуществления молекула, связывающая FAP/CD40, содержит по меньшей мере один (например, 2, 3 или 4) антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с FAP.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой молекуле, связывающей FAP/CD40, одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, специфически связывающийся с CD40, содержит три области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 представлены в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно. В некоторых конкретных вариантах осуществления аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 представлены в SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно; или аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 представлены в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления молекула, связывающая FAP/CD40, содержащая первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, где первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи; причем вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 18, соответственно; аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 19, соответственно.

В некоторых конкретных вариантах осуществления в вышеупомянутом первом антигенсвязывающем домене, который специфически связывается с FAP:

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно, аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 16, соответственно; или

аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 12, 13 и 17, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой молекуле, связывающей FAP/CD40, переменная область тяжелой цепи первого антигенсвязывающего домена, которая специфически связывается с FAP, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей; или

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой молекуле, связывающей FAP/CD40, первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с FAP, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC);

например, тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, а легкая цепь относится к изотипу каппа;

в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей; или

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой молекуле, связывающей FAP/CD40, первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на N-конце вариабельной области тяжелой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP;

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего

домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на С-конце варибельной области тяжелой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP;

одиночный варибельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на N-конце варибельной области легкой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP; и/или

одиночный варибельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на С-конце варибельной области легкой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP.

В некоторых вариантах осуществления одиночный варибельный домен иммуноглобулина вышеупомянутого второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, связан, напрямую или с помощью линкера, с первым антигенсвязывающим доменом, который специфически связывается с FAP; например, линкер имеет аминокислотную последовательность, представленную $(G_4S)_x$, где x независимо выбран из целого числа от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); например, линкер представляет собой аминокислотную последовательность, представленную $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$ или $(G_4S)_4$.

В некоторых вариантах осуществления в вышеупомянутой молекуле, связывающей FAP/CD40, второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD40, является мультивалентным (например, одна из вышеупомянутых молекул, связывающих FAP/CD40, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секундные антигенсвязывающие домены, которые специфически связываются с CD40). В некоторых конкретных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, является двухвалентным, четырехвалентным или шестивалентным. В некоторых конкретных вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, содержит 2, 3, 4, 5 или 6 указанных одиночных варибельных доменов иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления предлагается молекула, связывающая FAP/CD40, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 42 и 44-48, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную ей. В некоторых конкретных вариантах осуществления одна молекула, связывающая FAP/CD40, содержит две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи; в некоторых конкретных вариантах осуществления две первые полипептидные цепи идентичны, а две вторые полипептидные цепи идентичны.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP/CD40, может ингибировать рост опухоли (например, увеличение объема или увеличение массы опухоли) и/или метастазирование (например, метастазирование в несколько органов или в несколько тканей или отдаленное метастазирование) по меньшей мере примерно на 10%, например, по меньшей мере примерно на 20%, примерно на 30%, примерно на 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70%, примерно на 80% или примерно на 90%.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP/CD40, представляет собой биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антигенсвязывающий фрагмент включает, но не ограничивается ими, Fab, Fv, sFv, Fab', F(ab')₂, линейные антитела, одноцепочечные антитела, scFv, sdAb, sdFv, наноантитела, пептидные антитела, доменные антитела и полиспецифические антитела (биспецифические антитела, диаантитела, триантитела и тетраантитела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv) и представляет собой, например, scFv, Fv, Fab или Fab' фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к FAP/CD40 содержит одиночный вариабельный домен иммуноглобулина в вышеупомянутом втором антигенсвязывающем домене, специфически связывающемся с CD40, как предложено в вышеупомянутом изобретении, и вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) в первом антигенсвязывающем домене, специфически связывающемся с FAP, как предложено в вышеупомянутом изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в биспецифическом антителе к FAP/CD40:

первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, представляет собой первое антитело, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC);
и

второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, представляет собой второе антитело, представляющее собой VHH, имеющее CDR1, CDR2 и CDR3 в вышеупомянутой молекуле, связывающей CD40, предложенной в настоящем изобретении.

В некоторых конкретных вариантах осуществления VHH в качестве второго

антитела расположен на N-конце и/или C-конце тяжелой или легкой цепи первого антитела.

В некоторых конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к FAP/CD40 содержит 1 первое антитело и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (например, 2, 4 или 6) вторые антитела к VHH; первое антитело содержит два HC и две LC, где VH одного HC первого антитела образует антигенсвязывающий сайт с VL одной LC, а VH другого HC образует антигенсвязывающий сайт с VL другой LC.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первое антитело биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент может быть связано с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 вторыми антителами к VHH, и вторые антитела к VHH могут быть идентичными или разными, все могут быть связаны с N-концом тяжелой цепи первого антитела или все могут быть связаны с C-концом тяжелой цепи первого антитела или все могут быть связаны с N-концом легкой цепи первого антитела или все могут быть связаны с C-концом легкой цепи первого антитела или могут быть связаны с любой комбинацией N-конца тяжелой цепи, C-конца тяжелой цепи, N-конца легкой цепи и C-конца легкой цепи. В некоторых конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к FAP/CD40 содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где:

(i) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [тяжелая цепь первого антитела]-линкер 1-[второе антитело]; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(ii) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [тяжелая цепь первого антитела]-линкер 1-[второе антитело]₁-линкер 2-[второе антитело]₂; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(iii) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [тяжелая цепь первого антитела]-линкер 1-[второе антитело]₁-линкер 2-[второе антитело]₂-линкер 3-[второе антитело]₃; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(iv) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]-линкер 1-[тяжелая цепь первого антитела]; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(v) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]₂-линкер 2-[второе антитело]₁-линкер 1-[тяжелая цепь первого антитела]; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(vi) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]₃-линкер 3-[второе антитело]₂-линкер 2-[второе антитело]₁-линкер 1-[тяжелая

цепь первого антитела]; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(vii) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]₁-линкер 1-[тяжелая цепь первого антитела]-линкер 2-[второе антитело]₂; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(viii) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]₁-линкер 1-[второе антитело]₂-линкер 2-[тяжелая цепь первого антитела]-линкер 3-[второе антитело]₃; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

(ix) первая полипептидная цепь представляет собой от N-конца до C-конца: [второе антитело]₁-линкер 1-[тяжелая цепь первого антитела]-линкер 2-[второе антитело]₂-линкер 3-[второе антитело]₃; вторая полипептидная цепь представляет собой легкую цепь первого антитела;

где [вторичное антитело]₁, [вторичное антитело]₂ и [вторичное антитело]₃ могут быть идентичными или различными.

В некоторых вариантах осуществления вторые антитела к V_HN в вышеупомянутом биспецифическом антителе к FAP/CD40 связаны с первым антителом напрямую или с через линкер. Линкеры выбраны из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, представленных в виде (G_mS_n)_x, (GGNGT)_x, и (YGNGT)_x, где каждый m и n независимо выбран из целых чисел от 1 до 8 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), и x независимо выбран из целого числа от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20). Например, линкеры представляют собой аминокислотные последовательности, представленные G₄S, (G₄S)₂, (G₄S)₃, (G₄S)₄, (G₄S)₅ или (G₄S)₆. В некоторых вариантах осуществления линкер 1, линкер 2 и линкер 3 могут быть идентичными или различными.

В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь первого антитела биспецифического антитела к FAP/CD40 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи (C_H), а легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (V_L) и константную область легкой цепи (C_L). Первое антитело может представлять собой полноразмерное антитело.

В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь первого антитела биспецифического антитела к FAP/CD40 имеет изотип IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), например, изотип IgG1; и/или легкая цепь первого антитела имеет изотип каппа.

В некоторых вариантах осуществления два HC биспецифического антитела к FAP/CD40 содержат одни и те же CDR и/или две LC содержат одни и те же CDR. В некоторых конкретных вариантах осуществления два HC первого антитела содержат один

и тот же VH и/или две LC содержат один и тот же VL. В некоторых конкретных вариантах осуществления два HC первого антитела имеют идентичные аминокислотные последовательности и/или две LC имеют идентичные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления два вторых антитела VHH биспецифического антитела к FAP/CD40 имеют идентичные или разные аминокислотные последовательности. Например, два вторых антитела VHH имеют идентичные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к FAP/CD40 содержит две первые полипептидные цепи и две вторые полипептидные цепи, где для каждой полипептидной цепи: а) каждая из первых полипептидных цепей независимо содержит второе антитело VHH и тяжелую цепь (HC) первого антитела; и б) каждая из вторых полипептидных цепей независимо содержит легкую цепь (LC) первого антитела; где VHH связан с N-концом и/или C-концом HC второго антитела с помощью линкера;

или, i) каждая из первых полипептидных цепей независимо содержит тяжелую цепь (HC) первого антитела; и ii) каждая из вторых полипептидных цепей независимо содержит второе антитело VHH и легкую цепь (LC) первого антитела; где VHH связан с N-концом и/или C-концом LC первого антитела напрямую или через линкер.

В некоторых конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к FAP/CD40 содержит две идентичные первые полипептидные цепи и две идентичные вторые полипептидные цепи. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое конкурирует за связывание с тем же эпитопом с биспецифическим антителом к FAP/CD40 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления мутацию вводили в область Fc молекулы, связывающей FAP/CD40, или биспецифического антитела к FAP/CD40 по настоящему изобретению. Мутация представляет собой, например, мутацию, которая удаляет или уменьшает эффекторную функцию Fc IgG, включая, помимо прочего, N297A или D265A/N297A в IgG1, или L234A/L235A, L234A/L235A/P329G, L234E, L234F, L234E/L235F или L234E/L235F/P329G в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A в IgG2 или IgG4, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, и S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4.

В контексте мутаций, содержащихся в области Fc в настоящем документе, «/»

представляет собой «и»; например, «D265A/N297A» представляет собой «D265A и N297A»; то есть, Fc содержит мутации D265A и N297A; положения аминокислот мутаций пронумерованы в соответствии со схемой нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая молекула, связывающая FAP/CD40, или биспецифическое антитело к FAP/CD40, предложенное в настоящем изобретении, имеет одну или более из следующих характеристик:

- (a) связывания с FAP человека или его эпитопом со значением $K_D \leq 10^{-7}$;
- (b) связывания с CD40 человека или его эпитопом со значением $K_D \leq 10^{-7}$;
- (c) индуцирования иммунной стимуляции CD40-экспрессирующих антигенпрезентирующих клеток (APC);
- (d) повышения активации APC (например, дендритных клеток) и/или стимулирования пролиферации APC (например, дендритных клеток);
- (e) стимуляции опухолеспецифических Т-клеточных ответов;
- (f) вызывания или стимулирования апоптоза опухолевых клеток; и/или
- (g) ингибирования роста опухоли и/или метастазирования.

Кроме того, антитело к CD40, антитело к FAP и молекула, связывающая FAP/CD40, по настоящему изобретению являются устойчивыми к термической обработке или имеют относительно высокую стабильность. Например, после 30 дней обработки при 40 °C не наблюдается значительной агрегации или деградации, и они стабильны по меньшей мере при 60 °C.

Полинуклеотид

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим молекулу, связывающую CD40, молекулу, связывающую FAP, молекулу, связывающую FAP/CD40, и биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут представлять собой РНК, ДНК или кДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению представляют собой по существу выделенные нуклеиновые кислоты.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также могут быть в форме вектора, и они могут присутствовать в векторе и/или могут быть частью вектора. Вектор представляет собой, например, плазмиду, космиду, YAC (искусственная дрожжевая хромосома) или вирусный вектор. Вектор может, в частности, представлять собой вектор экспрессии, то есть вектор, который обеспечивает *in-vitro* и/или *in-vivo* экспрессию молекулы, связывающей CD40 (то есть в подходящих клетках-хозяевах, организмах-хозяевах и/или системах экспрессии). Вектор экспрессии обычно содержит по меньшей

мере одну из нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, который функционально связан с одним или более подходящими регуляторными элементами экспрессии (например, промоторами, энхансерами и терминаторами). 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 молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, или биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, представляют собой, например, промоторы, энхансеры, терминаторы, интеграторы, маркеры отбора, лидерные последовательности и репортерные гены.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть изготовлены или получены 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 могут быть выделены из подходящего природного источника.

Клетка-хозяин

В настоящем изобретении предложена рекомбинантная клетка-хозяин, которая экспрессирует или способна экспрессировать одну или более из молекул, связывающих CD40, молекул, связывающих FAP, молекул, связывающих FAP/CD40, биспецифических антител к FAP/CD40 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению и/или содержит нуклеиновые кислоты или векторы 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 methanolica*) и *Hansenula*.

Клетки млекопитающих включают, например, клетки HEK293, клетки CHO (клетки яичника китайского хомячка), клетки ВНК (клетки почки новорожденного хомячка), 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.

Клетки по настоящему изобретению не могут развиваться в целые растения или отдельных животных.

Способ изготовления или получения

Настоящее изобретение относится к способу получения молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, или биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, причем способы обычно включают следующие стадии:

- культивирования клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, или биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению; и

- выделения представляющего интерес белка, экспрессируемого клеткой-хозяином, из культуры; и

- необязательно, дополнительной очистки и/или модификации представляющего интерес белка по настоящему изобретению.

Молекула, связывающая CD40, молекула, связывающая FAP, молекула, связывающая FAP/CD40, или биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть получены внутриклеточно (например, в цитоплазме, в периплазме или в тельцах включения) в клетке, описанной выше, а затем выделены из клетки-хозяина и необязательно дополнительно очищены; или могут быть получены внеклеточно (например, в среде, в которой культивируют клетку-хозяина), а затем выделены из среды и необязательно дополнительно очищены.

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 представляющих интерес белков, подходящих для применения при получении связывающих молекул или антител по настоящему изобретению, хорошо известны специалистам в данной области техники. Способы получения и очистки антител 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). Сконструированные антитела по настоящему изобретению также могут быть получены и очищены обычными способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно

клонировать и рекомбинировать в вектор экспрессии. Векторы экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина можно использовать для стабильной трансфекции клеток. Системы экспрессии млекопитающих могут привести к гликозилированию антител, в частности, на высококонсервативном N-конце области Fc. Стабильные клоны получали путем экспрессии антител, специфически связывающихся с антигеном человеческого происхождения. Положительные клоны размножали в бессывороточной среде биореактора для получения антител. Культуральная среда с секретируемым антителом может быть очищена и собрана обычными способами. Антитела могут быть отфильтрованы и концентрированы общепринятыми способами. Растворимые смеси и мультимеры также можно удалить обычными методами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученные продукты должны быть немедленно заморожены, например, при -70°C , или лиофилизированы.

Однако молекула, связывающая CD40, молекула, связывающая FAP, молекула, связывающая FAP/CD40, или биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также могут быть получены другими способами, известными в области получения белков, такими как химический синтез, включая твердофазный или жидкофазный синтез.

Композиция

Настоящее изобретение относится к композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей профилактически или терапевтически эффективное количество молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента или кодирующего полинуклеотида, описанного выше в настоящем изобретении, и одного или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, буферов или эксципиентов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления единичная доза фармацевтической композиции может содержать от 0,01 до 99 мас.% молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP/CD40, или биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых других конкретных вариантах осуществления единичная доза фармацевтической композиции содержит молекулу, связывающую CD40, молекулу, связывающую FAP/CD40, или биспецифическое антитело к FAP/CD40 в количестве 0,1-2000 мг; и в некоторых конкретных вариантах осуществления составляет 1-1000 мг.

Набор

Настоящее изобретение относится к набору, содержащему молекулу, связывающую

CD40, молекулу, связывающую FAP, молекулу, связывающую FAP/CD40, биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или кодирующий полинуклеотид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления дополнительно предложен диагностический реагент, содержащий полинуклеотид, описанный выше, и соответствующее диагностическое применение.

Способ лечения заболевания и фармацевтическое применение

Настоящее изобретение относится к применению молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, кодирующего полинуклеотида или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для предотвращения и/или лечения заболевания и способа предотвращения и/или лечения заболевания с их использованием, где заболевание может быть или не быть связано с сигнальным путем CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу предотвращения и/или лечения заболевания, связанного с CD40, включающему введение субъекту профилактически и/или терапевтически эффективного количества молекулы, связывающей CD40, по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей молекулу, связывающую CD40, по настоящему изобретению. В настоящем изобретении дополнительно предложено применение молекулы, связывающей CD40, по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с CD40 или CD40L, или расстройств, связанных с CD40 или CD40L.

Молекула, связывающая CD40, молекула, связывающая FAP, молекула, связывающая FAP/CD40, биспецифическое антитело к FAP/CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, кодирующий полинуклеотид или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть использованы отдельно или в комбинации с другими противораковыми или опухолевыми терапевтическими подходами (например, другими иммуногенными агентами, стандартными методами лечения рака или другими молекулами антител) для ингибирования рака или роста опухоли.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу предотвращения и/или лечения рака или опухоли, включающему введение пациенту или субъекту профилактически и/или терапевтически эффективного количества молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, кодирующего полинуклеотида или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для ингибирования роста опухолевых клеток у пациента или субъекта. В

некоторых конкретных вариантах осуществления рак предпочтительно представляет собой, но не ограничивается, рак, который реагирует на иммунотерапию.

В вышеуказанных способах или применении неограничивающие примеры рака или опухоли включают рак легкого, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак печени, лимфому, гематологические злокачественные новообразования, рак головы и шеи, глиому, рак желудка, рак носоглотки, рак гортани, рак шейки матки, опухоли тела матки и остеосаркому. Примеры других видов рака, которые можно лечить с использованием способа согласно настоящему изобретению, включают: рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак предстательной железы, рак кожи или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак анального канала, рак яичка, рак фаллопиевой трубы, рак эндометрия, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, рак почечной лоханки, опухоль центральной нервной системы (CNS), первичную лимфому CNS, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, нейроглиома ствола мозга, аденома гипофиза, саркома Капоши, эпидермальная карцинома, плоскоклеточная карцинома, Т-клеточная лимфома и рак, вызванный окружающей средой, включая рак, вызванный асбестом, и комбинации этих видов рака. В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак, описанные выше, являются метастатическими и/или распространенными.

Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к способу предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания у субъекта или пациента, включающему введение субъекту или пациенту молекулы, связывающей CD40, молекулы, связывающей FAP, молекулы, связывающей FAP/CD40, биспецифического антитела к FAP/CD40 или его антигенсвязывающего фрагмента, кодирующего полинуклеотида или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для предотвращения и/или лечения инфекционного заболевания у субъекта. В способе, аналогичном применению для рака или опухоли, описанному выше, молекула, связывающая CD40 может быть использована отдельно или в комбинации с вакцинами для стимуляции иммунных ответов на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, к которым может быть особенно применен способ лечения, включают патогены, для которых в настоящее время нет

эффективной вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины не являются полностью эффективными. Патогены включают, но не ограничиваются ими, ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), вирусы гепатита (А, В и С), вирусы гриппа, вирусы герпеса, лямблии, малярии, лейшмании, золотистого стафилококка и синегнойной палочки.

Обнаружение

Настоящее изобретение относится к композиции для обнаружения CD40 или FAP, содержащей молекулу, связывающую CD40, или молекулу, связывающую FAP, по настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу, системе или устройству для обнаружения CD40 или FAP *in vivo* или *in vitro*, включающему обработку образца молекулой, связывающей CD40, или молекулой, связывающей FAP, 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, которое связывается с CD40 или FAP;
(2) обнаружение комплекса, образованного между антителом, которое связывается с CD40 или FAP 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 или FAP в образце.

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

(1) введение субъекту молекулы, связывающей CD40, или молекулы, связывающей FAP; и

(2) обнаружение образования комплекса между молекулой, связывающей CD40, или молекулой, связывающей FAP, и субъектом.

Обнаружение может включать определение места или времени образования комплекса. Молекула, связывающая CD40, или молекула, связывающая FAP, могут быть мечены детектируемым веществом, так что обнаружение может быть достигнуто путем обнаружения метки. Подходящие детектируемые вещества включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Образование комплекса между молекулой, связывающей CD40, и CD40 или молекулой, связывающей FAP, и FAP может быть обнаружено путем измерения

или визуализации антитела, которое связывается или не связывается с CD40 или FAP. Могут быть использованы обычные анализы обнаружения, такие как иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или иммуногистохимия тканей. Для целей обнаружения молекула, связывающая CD40, или молекула, связывающая FAP, по настоящему изобретению могут быть мечены хромофором флуорофором.

В некоторых вариантах осуществления дополнительно предложен набор, содержащий молекулу, связывающую CD40, или молекулу, связывающую FAP, и может дополнительно содержать инструкции для диагностического применения. Набор дополнительно может содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, такой как метка или дополнительный диагностический агент. Для применения *in vivo* молекула, связывающая CD40, или молекула, связывающая FAP, могут быть составлены в фармацевтическую композицию.

Определения

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». «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.

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). Клетка, которая эндогенно экспрессирует CD40, представляет собой любую клетку, характеризующуюся поверхностной экспрессией CD40, включая, но не ограничиваясь ими, нормальные и неопластические В-клетки, интердигитальные клетки, базальные эпителиальные клетки, клетки карциномы, макрофаги, эндотелиальные клетки, фолликулярные дендритные

клетки, клетки миндалин и плазматические клетки, полученные из костного мозга. В настоящем изобретении «CD40» относится к любому нативному CD40, полученному из любого позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. 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 8 настоящего изобретения. В настоящем изобретении «CD40» охватывает полноразмерный непротессированный CD40, а также любую форму CD40, которая является результатом процессинга в клетке, и дополнительно охватывает встречающиеся в природе варианты CD40, такие как сплайс-варианты или аллельные варианты. В одном варианте осуществления CD40-связывающая молекула по настоящему изобретению способна специфически связываться с CD40 человека, мыши и/или яванского макака.

«Белок активации фибробластов (FAP)» и «антиген FAP», также известный как FAP или сепраза пролилэндопептидазы (EC 3.4.21), относятся к любому нативному FAP, полученному из любого позвоночного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди), приматы, отличные от человека (например, яванские макаки), и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В настоящем изобретении «FAP» охватывает полноразмерный непротессированный FAP, а также любую форму FAP, которая является результатом процессинга в клетке, и дополнительно охватывает встречающиеся в природе варианты FAP, такие как сплайс-варианты или аллельные варианты. В одном варианте осуществления FAP-связывающая молекула по настоящему изобретению способна специфически связываться с FAP человека, мыши и/или яванского макака. Аминокислотная последовательность FAP человека показана под номером доступа UniProt (www.uniprot.org) Q12884 (версия 149, SEQ ID NO: 2) или NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2 или GeneBank под регистрационным номером AAC51668. Внеклеточный домен (ECD) FAP человека простирается от положения аминокислоты 26 до 760. Аминокислотные последовательности, такие как ECD His-меченого FAP человека, показаны в Таблице 2 настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность FAP мыши показана под номером доступа UniProt P97321 (версия 126, SEQ ID NO: 143) или NCBI RefSeq NP_032012.1. Внеклеточный домен (ECD) FAP мыши простирается от положения аминокислоты 26 до 761. В некоторых вариантах осуществления FAP-связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом FAP.

«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 вариабельными областями (V-области); остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и, таким образом, называются константными областями (C-области). Вариабельные области включают 3 гипервариабельные области (CDR) и 4 каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями. Три гипервариабельные области определяют специфичность антитела и таким образом также известны как области, определяющие комплементарность, (CDR). Каждая из вариабельных областей легкой цепи (VL) и вариабельных 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.

«Биспецифическое антитело» включает антитела (включая антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как одноцепочечные антитела), способные специфически связываться с двумя различными антигенами или по меньшей мере двумя различными эпитопами одного и того же антигена. Типичные структурные модели биспецифических антител включают биспецифические антитела, такие как KiH, CrossMAb,

триомаб-квадрома, Fc Δ Adp, ART-Ig, BiMAb, Biclomics, BEAT, DuoBody, Azymetric, XmAb, 2:1 TCB, 1Fab-IgG TDB, FynomAb, два в одном/DAF, scFv-Fab-IgG, DART-Fc, LP-DART, CODV-Fab-TL, HLE-BiTE, F(ab)₂-CrossMAb, IgG-(scFv)₂, Bs4Ab, DVD-Ig, Tetravalent-DART-Fc, (scFv)₄-Fc, CODV-Ig, mAb2 и F(ab)₄-CrossMAb (см. Aran F. Labrijn et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, том 18, страницы 585-608 (2019); Chen S1 et al., *J Immunol Res.*, Feb. 11, 2019; 2019: 4516041).

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 AbM, схему нумерации IMGТ, определение по контакту 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 контексте настоящего изобретения 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. Связи между схемами нумерации CDR

CDR	по IMGT	по Кабату	по AbM	по Чотиа	по контакту
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 согласно настоящему изобретению соответствуют известной схеме нумерации по Кабату с точки зрения количества и положений.

«Домен» полипептида или белка относится к структуре свернутого белка, которая способна поддерживать свою третичную структуру независимо от остальной части белка. Как правило, домен отвечает за одно функциональное свойство белка и во многих случаях может быть добавлен, удален или перенесен на другие белки без потери функций остальной части белка и/или домена.

«Домен иммуноглобулина» относится к глобулярной области цепи антитела (например, цепи обычного антитела со структурой тетрапептидной цепи или антитела с тяжелой цепью) или полипептиду, по существу состоящему из таких глобулярных областей. Домен иммуноглобулина характеризуется тем, что он сохраняет кратность иммуноглобулина, характерную для молекулы антитела, и состоит из 2-слойного сэндвича из около 7 антипараллельных β -цепей, расположенных в двух β -листах, необязательно стабилизированных консервативной дисульфидной связью.

«Вариабельный домен иммуноглобулина» относится к домену иммуноглобулина, по существу состоящему из четырех «каркасных областей», упомянутых в данном документе

и далее как «каркасная область 1» или «FR1», «каркасная область 2» или «FR2», «каркасная область 3» или «FR3» и «каркасная область 4» или «FR4», где каркасные области прерываются тремя «областями, определяющими комплементарность» или «CDR», упомянутыми в данной области техники и далее как «область 1, определяющая комплементарность» или «CDR1», «область 2, определяющая комплементарность» или «CDR2» и «область 3, определяющая комплементарность» или «CDR3». Таким образом, общая структура или последовательность переменного домена иммуноглобулина может быть выражена следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Переменные домены иммуноглобулина обладают специфичностью к антигену благодаря наличию антигенсвязывающего сайта.

«Переменный домен иммуноглобулина» относится к домену иммуноглобулина, по существу состоящему из четырех «каркасных областей», упомянутых в данном документе и далее как «каркасная область 1» или «FR1», «каркасная область 2» или «FR2», «каркасная область 3» или «FR3» и «каркасная область 4» или «FR4», где каркасные области прерываются тремя «областями, определяющими комплементарность» или «CDR», упомянутыми в данной области техники и далее как «область 1, определяющая комплементарность» или «CDR1», «область 2, определяющая комплементарность» или «CDR2» и «область 3, определяющая комплементарность» или «CDR3». Таким образом, общая структура или последовательность переменного домена иммуноглобулина может быть выражена следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Переменные домены иммуноглобулина обладают специфичностью к антигену благодаря наличию антигенсвязывающего сайта.

«Каркасная область антитела (FR)» относится к части переменной области, которая служит каркасом для антигенсвязывающих петель (CDR) переменной области.

«Одиночный переменный домен иммуноглобулина» обычно используется для обозначения переменного домена иммуноглобулина (который может представлять собой домен тяжелой или легкой цепи, включая домен VH, VHH или VL), который может образовывать функциональный антигенсвязывающий сайт без взаимодействия с другими переменными доменами (например, без взаимодействий VH/VL, которые требуются между доменами VH и VL обычных четырехцепочечных моноклональных антител). Примеры «одиночных переменных доменов иммуноглобулина» включают наноантитела (включая VHH, гуманизированный VHH и/или верблюдоподобная VH, например, верблюдоподобная человеческая VH), IgNAR, домены, (однодоменные) антитела в качестве доменов VH или полученные из доменов VH (таких как dAbsTM) и (однодоменные) антитела в качестве доменов VL или полученные из доменов VL (таких как dAbsTM). Как

правило, предпочтительными являются одиночные переменные домены иммуноглобулина на основе и/или полученные из переменных доменов тяжелой цепи (таких как домены VH или VHH). Конкретный пример одиночного переменного домена иммуноглобулина представляет собой «домен VHH» (или сокращенно «VHH»), как определено ниже.

«Домен VHH», также известный как однодоменное антитело с тяжелой цепью, VHH, домен V_HH, фрагмент антитела VHH, антитело VHH или наноантитело, представляет собой переменный домен антигенсвязывающего иммуноглобулина, известного как «антитело с тяжелой цепью» (т. е. «антитело, лишенное легких цепей») (Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R., “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature 363, 446-448 (1993)). Термин «домен VHH» используется для отличия переменного домена от переменного домена тяжелой цепи (который упоминается в настоящем документе как «домен VH») и переменного домена легкой цепи (который упоминается в настоящем документе как «домен VL»), присутствующих в обычных антителах со структурой тетрапептидной цепи. Домены VHH специфически связываются с эпитопом без необходимости в дополнительном антигенсвязывающем домене (в отличие от домена VH или VL в обычных антителах со структурой тетрапептидной цепи, и в этом случае эпитоп распознается доменом VL вместе с доменом VH). Домен VHH представляет собой небольшую, стабильную и эффективную единицу распознавания антигена, образованную одним доменом иммуноглобулина. Термины «однодоменное антитело с тяжелой цепью», «домен VHH», «VHH», «домен V_HH», «фрагмент антитела VHH», «антитело VHH», «Nanobody®» и «домен Nanobody®» («Nanobody» является товарным знаком Ablynx N.V., Гент, Бельгия) используются взаимозаменяемо. «Домены VHH» включают, но не ограничиваются ими, природные антитела, полученные от верблюда, антитела, полученные от верблюда, а затем гуманизированные, или антитела, полученные путем скрининга с помощью методов фагового дисплея. Общее количество аминокислотных остатков в домене VHH обычно находится в диапазоне от 110 до 120, часто от 112 до 115. Однако следует отметить, что меньшие и более длинные последовательности также могут быть подходящими для целей, описанных в настоящем изобретении. Способы получения VHH, которые связываются с конкретным антигеном или эпитопом, ранее были описаны в следующих документах: R. van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240 (2000) 185-195; Li et al., J Biol Chem., 287 (2012)13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12), pp.2645-2652, 17 June, 2009 и WO94/04678.

Как хорошо известно в данной области техники для доменов VH и для доменов VHH,

общее количество аминокислотных остатков в каждой из CDR может варьироваться и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, указанных в нумерации по Кабату (то есть одно или более положений в соответствии с нумерацией по Кабату могут не занимать в фактической последовательности, или фактическая последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем количество, допускаемое нумерацией по Кабату). Это означает, что, как правило, нумерация по Кабату может соответствовать или не соответствовать фактической нумерации аминокислотных остатков в фактической последовательности. Другие системы нумерации или схемы нумерации включают Чотиа, IMGT и AbM.

«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. Примеры «гуманизации» включают «гуманизацию» доменов V_HH, полученных от верблюдов, путем замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности исходной последовательности V_HH одним или более аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующих положениях в V_H-домене обычного человеческого антитела со структурой тетрапептидной цепи (также называемой в настоящем описании «оптимизацией последовательности»); в дополнение к гуманизации «оптимизация последовательности» может также включать другие модификации последовательности с помощью одной или более мутаций, обеспечивающих улучшенные свойства V_HH, такие как удаление потенциальных сайтов посттрансляционной модификации). Гуманизированный домен V_HH может содержать одну или более полностью человеческих последовательностей каркасной области. В дополнении, во избежание снижения активности, вызванного снижением иммуногенности, последовательность каркасной области в переменной области антитела человека может быть подвергнута минимальной реверсивной или обратной мутации для поддержания активности.

«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*). «Полностью человеческое антитело» не включает «гуманизированные антитела».

Как правило, молекула, связывающая CD40, или молекула, связывающая FAP, по настоящему изобретению будут связываться с антигеном, подлежащим связыванию (т.е. CD40 или FAP), с константой диссоциации (K_D) предпочтительно от 10^{-7} до 10^{-10} моль/л (M), более предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-10} моль/л, даже более предпочтительно от 10^{-9} до 10^{-10} или менее, и/или с константой ассоциации (K_A) по меньшей мере 10^7 M, предпочтительно по меньшей мере 10^8 M, более предпочтительно по меньшей мере 10^9 M или более предпочтительно по меньшей мере 10^{10} M, как измерено в анализе Biacore, KinExA или Fortibio. Любое значение K_D , превышающее 10^{-4} M, обычно считается указывающим на неспецифическое связывание. Специфическое связывание антигенсвязывающего белка с антигеном или эпитопом может быть измерено любым подходящим известным способом, включая, например, анализы поверхностного плазмонного резонанса (SPR), анализ Скэтчарда и/или анализ конкурентного связывания (например, радиоиммуноанализ (RIA), иммуноферментный анализ (EIA) и сэндвич-конкурентный анализ), описанные в настоящем изобретении.

«Конкурировать» при использовании в случае, когда антигенсвязывающие белки (например, нейтрализующие антигенсвязывающие белки или нейтрализующие антитела) конкурируют за один и тот же эпитоп, относится к конкуренции между антигенсвязывающими белками, которая измерена с помощью следующего анализа, в котором тестовый антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, антигеном CD40 или его фрагментом). Многочисленные типы конкурентных анализов связывания доступны для определения того, конкурирует ли антигенсвязывающий белок с другим, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA) и сэндвич-конкурентный анализ (см., например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253), твердофазный прямой биотин-авидин EIA (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный прямой меченый анализ и твердофазный прямой меченый сэндвич-анализ (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press), твердофазный прямой меченый RIA с меткой I-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15), твердофазный прямой биотин-авидин EIA (см., например,

Cheung, et al., 1990, *Virology* 176: 546-552) и прямой меченый RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Как правило, анализ относится к применению очищенного антигена (который находится на твердой поверхности или поверхности клетки), который связывается с немеченым детектирующим антигенсвязывающим белком и меченым эталонным антигенсвязывающим белком. Конкурентное ингибирование измеряли путем измерения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клеткой в присутствии анализируемого антигенсвязывающего белка. Как правило, анализируемый антигенсвязывающий белок существует в избыточном количестве. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентных анализов (конкурентные антигенсвязывающие белки), включают: антигенсвязывающие белки, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок; и антигенсвязывающие белки, которые связываются с эпитопом, достаточно близким к эпитопу, с которым связывается эталонный антигенсвязывающий белок, и два эпитопа пространственно препятствуют друг другу от связывания. Как правило, когда конкурентный антигенсвязывающий белок существует в избыточном количестве, специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном ингибируется (например, снижается) по меньшей мере на 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или более.

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, антитела, которые конкурируют за связывание с одним и тем же эпитопом на CD40 или FAP с молекулами антител по настоящему изобретению, могут быть получены обычными методами, известными специалистам в данной области техники.

«CD40-связывающая молекула» относится к любому белку, способному специфически связываться с CD40, или любой молекуле, содержащей белок. CD40-связывающая молекула может включать антитела к CD40, как определено в настоящем изобретении, или их конъюгаты. Молекула, связывающая CD40, дополнительно включает антитела суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) или молекулы с привитой CDR. «Молекула, связывающая CD40» по настоящему изобретению может содержать по меньшей

мере один одиночный переменный домен иммуноглобулина (такой как V_HH), который связывается с CD40. В некоторых вариантах осуществления «молекула, связывающая CD40» может содержать 2, 3, 4 или более одиночных переменных доменов иммуноглобулина (таких как V_HH), которые связываются с CD40. Молекула, связывающая CD40, по настоящему изобретению может дополнительно содержать, в дополнение к одиночному переменному домену иммуноглобулина CD40, линкер и/или фрагмент с эффекторной функцией, такой как фрагмент, продлевающий период полувыведения (например, одиночный переменный домен иммуноглобулина, который связывается с сывороточным альбумином), и/или партнер по слиянию (такой как сывороточный альбумин) и/или конъюгированный полимер (такой как PEG (полиэтиленгликоль)) и/или область Fc. В некоторых вариантах осуществления «молекула, связывающая CD40» по настоящему изобретению дополнительно охватывает биспецифические/мультиспецифические антитела, содержащие иммуноглобулины, которые связываются с различными антигенами (например, первое антитело, которое связывается с первым антигеном (например, CD40), и второе антитело, которое связывается со вторым антигеном (например, FAP), необязательно третье антитело, которое связывается с третьим антигеном, и дополнительно необязательно четвертое антитело, которое связывается с четвертым антигеном).

«Молекула, связывающая FAP» относится к любому белку, способному специфически связываться с FAP, или любой молекуле, содержащей белок. Молекула, связывающая FAP может включать антитела к FAP, как определено в настоящем изобретении, или их конъюгаты.

«Молекула, связывающая FAP/CD40» относится к любому белку, способному специфически связываться с CD40 и FAP, или любой молекуле, содержащей белок. Молекула, связывающая FAP/CD40 может включать антитела к FAP/CD40, как определено в настоящем изобретении, или их конъюгаты.

«Связываться с CD40» или «связывать CD40» относится к способности взаимодействовать с CD40 или его эпитопом, где CD40 или его эпитоп могут быть получены от человека. «Связываться с FAP» «связывать FAP» относится к способности взаимодействовать с FAP или его эпитопом, где FAP или его эпитоп могут быть получены от человека. «Антигенсвязывающий сайт» в настоящем изобретении относится к прерывистому трехмерному пространственному сайту на антигене, который распознается антителом 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 фагового, дрожжевого или рибосомального дисплея). 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. Например, для антитела по настоящему изобретению, которое связывается с CD40 человека, мономеры и мультиимеры (например, димеры, тримеры и т. д.) CD40 человека и усеченные варианты, и другие варианты CD40 человека все называются антигенами.

«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 настоящем описании, такие как рентгеновская кристаллография и двумерный ядерный магнитный резонанс.

«Специфическое связывание» или «селективное связывание» относится к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Например, 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 ((бычий сывороточный альбумин)) и т. д.), при измерении 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. «Антигенраспознающее антитело» используется взаимозаменяемо в настоящем описании со «специфически связанным антителом».

«Аффинность связывания» или «аффинность» используется в настоящем изобретении 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 связана с k_a и k_d посредством уравнения $K_D = k_d/k_a$. Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно хорошо известными способами и может быть рассчитано способами, такими как описанные Caseci 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, РИА и проточную цитометрию, а также другие анализы, приведенные в другом месте настоящего изобретения. 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 Biacore™ 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).

«Консервативная замена» относится к замене на другой аминокислотный остаток, имеющий свойства, аналогичные с исходным аминокислотным остатком. 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.

«Гомология», «идентичность» или «идентичность последовательности» относится к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положения в двух сравниваемых последовательностях заняты идентичными нуклеотидами или аминокислотными мономерами, 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.

«Клетка-хозяин» включает отдельные клетки или клеточные культуры, которые могут быть или были реципиентом вектора для включения полинуклеотидной вставки. Клетка-хозяин включает потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или геномному комплементу ДНК) исходной родительской клетке из-за естественных, случайных или преднамеренных мутаций. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные и/или трансформированные *in vivo* полинуклеотидами по настоящему изобретению. «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.

Термины «ингибирование» и «блокирование» используются взаимозаменяемо и охватывают частичное и полное ингибирование/блокирование. Предполагается, что термин «ингибирование роста» (например, с участием клеток) включает любое измеримое снижение роста клеток.

«Агонистическая активность», «агонистическая активность» или «агонизм»

относится к функции вещества как агониста. Связывание агониста с клеточным рецептором инициирует реакцию или активность, аналогичную или идентичную реакции или активности, инициированной природным лигандом рецептора. Например, агонист CD40 или антитело-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-κB-индуцирующая киназа), I-κB-киназы (IKKα/β), фактор транскрипции NF-κB, 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.

«Заболевание, связанное с CD40» или «состояние, связанное с CD40» относится к состоянию, при котором клетки, экспрессирующие CD40, модифицированы или устранены. 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.

«Пролиферативное заболевание» относится к состоянию, связанному с определенной степенью аномальной пролиферации клеток. В одном варианте пролиферативное состояние представляет собой рак.

«Рак», «злокачественный», «пролиферативное состояние» и «опухоль» не являются взаимоисключающими при упоминании в настоящем описании.

«Предотвращение рака» или «профилактика рака» относится к задержке, ингибированию или предотвращению возникновения рака у субъекта, у которого начало онкогенеза или онкогенеза не было доказано, но была выявлена предрасположенность к раку, как определено, например, с помощью генетического скрининга или иным образом. Термин также охватывает лечение субъекта, имеющего предраковые состояния, чтобы остановить прогрессирование или вызвать регресс предраковых состояний к злокачественному новообразованию.

«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, например, терапевтические, фармакокинетические, диагностические, исследовательские и экспериментальные методы. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клетками и приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клетками. «Лечение», «введение» и «обработка» также относятся к обработке, например, клетки, реагентом, диагностическим агентом, связывающей композицией или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. При применении к человеческим, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтическому лечению, превентивным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим применениям.

«Лечение» или «обработка» относится к введению терапевтического агента, такого как терапевтический агент, содержащего любое антитело по настоящему изобретению или его фармацевтическую композицию, либо вовнутрь, субъекту, который имел, подозревается в наличии или предрасположен к одному или более пролиферативным заболеваниям или их симптомам, на которые, как известно, что терапевтический агент оказывает терапевтическое действие. Как правило, терапевтический агент вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у субъекта или популяции, получавших лечение, для индуцирования регрессии таких симптомов или для 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 субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья субъекта, способ, и доза введения, а также тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или режим введения, чтобы избежать значительных побочных эффектов или токсических эффектов. Субъект настоящего изобретения может представлять собой животное или человека.

«Субъект» или «пациент» в настоящем изобретении относится к млекопитающему, в частности, примату и, в частности, человеку.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показано связывание антител к FAP Ab9, Ab10, Ab14 и Ab15 с FAP человека на клеточной поверхности, с 28H1 в качестве положительного контроля и изотипом IgG1 в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 2 показано связывание антител к FAP Ab9, Ab10, Ab14 и Ab15 с FAP мыши на клеточной поверхности, с 28H1 в качестве положительного контроля и изотипом IgG1 в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 3 показано связывание антител к CD40 A12 и A297 с CD40 человека на поверхности клеток Raji, с 9E5-SELFNS в качестве положительного контроля и IgG1 в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 4 показано связывание антител к CD40 A12 и A297 с CD40 человека на поверхности клеток HEK293, с 9E5-SELFNS в качестве положительного контроля и IgG1 в качестве отрицательного контроля; ордината представляет собой процент активности агониста относительно 200 нМ 9E5-SELFNS.

На фиг. 5А показана аффинность гуманизированных антител к CD40 A12_V1, A12_V2 и A12_V3 к клеткам HEK293, сверхэкспрессирующим CD40 человека, как измерено с помощью проточной цитометрии. На фиг. 5В показана аффинность гуманизированных антител к CD40 A297_V1, A297_V2, A297_V3 и A297_V4 к клеткам HEK293, сверхэкспрессирующим CD40 человека, как измерено с помощью проточной цитометрии. Все анализы использовали 9E5-SELFNS в качестве положительного контроля и hIgG в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 6А показана FcγRIIb-опосредованная активация клеток HEK-Blue™CD40L гуманизированными антителами к CD40 A12_V1, A12_V2 и A12_V3. На фиг. 6В показана FcγRIIb-опосредованная активация клеток HEK-Blue™CD40L гуманизированными антителами к CD40 A297_V1, A297_V2, A297_V3 и A297_V4. Все анализы использовали 9E5-SELFNS в качестве положительного контроля и hIgG в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 7 показана схематическая диаграмма структур биспецифических антител к FAP/CD40.

На фиг. 8А показана аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 Ab10-A12V2-2, Ab10-A12V2-4, Ab10-A297V3-2 и Ab10-A297V3-4 к стабильно трансфицированному штамму CHOК1/FAP, высоко экспрессирующему антиген FAP человека, как измерено с помощью проточной цитометрии. На фиг. 8В и 8С показана аффинность вышеупомянутых биспецифических антител к FAP/CD40 к стабильно трансфицированным штаммам CHOК1/FAP, высоко экспрессирующим антиген FAP мыши и антиген FAP яванского макака, как измерено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 9А показана аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 Ab10-A12V2-2, Ab10-A12V2-4, Ab10-A297V3-2 и Ab10-A297V3-4 к стабильно трансфицированному штамму HEK-Blue™CD40L, высоко экспрессирующему антиген CD40 человека, как измерено с помощью проточной цитометрии. На фиг. 9В показана аффинность вышеупомянутых биспецифических антител к FAP/CD40 к клеткам HEK293, высоко экспрессирующим антиген CD40 яванского макака, как измерено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 10 показана аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 Ab10-A297V3-2 и Ab10-A297V3-4 к CD40 на незрелых DC человека, как измерено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 11 показан эффект стимулирования созревания DC биспецифическими антителами к FAP/CD40 Ab10-A12V2-2, Ab10-A12V2-4, Ab10-A297V3-2 и Ab10-A297V3-4 градиента концентрации в отсутствие перекрестного сшивания стабильно

трансфицированных клеток CHOК1/FAP с LPC, hIgG1 и носителем в качестве контролей.

На фиг. 12 показан эффект, способствующий созреванию DC биспецифических антител к FAP/CD40 Ab10-A12V2-2, Ab10-A12V2-4, Ab10-A297V3-2 и Ab10-A297V3-4, в отношении градиента концентрации в присутствии перекрестного сшивания стабильно трансфицированных клеток CHOК1/FAP с LPC, hIgG1 и носителем в качестве контрольного образца.

На фиг. 13А показаны кривые роста опухоли после инъекций однократной дозы антитела Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 гуманизированным мышам с hCD40, несущим опухоль mFAP-МС38. На фиг. 13В показана соответствующая активация В-клеток периферической крови у мышей. На фиг. 13С показаны кривые соответствующих изменений массы тела мышей. На фиг. 13D показаны соответствующие изменения количества тромбоцитов у мышей. На фиг. 13Е показано соответствующее влияние на функцию печени у мышей.

На фиг. 14А показаны кривые роста опухоли после инъекций многократных доз антитела Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 гуманизированным мышам с hCD40, несущим опухоль mFAP-МС38. На фиг. 14В показана соответствующая активация В-клеток периферической крови у мышей. На фиг. 14С показаны кривые соответствующих изменений массы тела мышей. На фиг. 14D показаны соответствующие изменения количества тромбоцитов у мышей. На фиг. 14Е показано соответствующее влияние на функцию печени у мышей.

На фиг. 15А показаны кривые роста опухоли после инъекций многократных доз антитела Ab10-A12V2-2 гуманизированным мышам с hCD40, несущим опухоль mFAP-МС38. На фиг. 15В показаны кривые соответствующих изменений массы тела мышей. На фиг. 15С показано соответствующее влияние на функцию печени у мышей. На фиг. 15D показаны соответствующие изменения количества тромбоцитов у мышей.

На фиг. 16А показаны кривые роста опухоли после инъекций однократной дозы антитела Ab10-A12V2-4 гуманизированным мышам с hCD40, несущим опухоль mFAP-МС38. На фиг. 16В показаны кривые соответствующих изменений массы тела мышей. На фиг. 16С показано соответствующее влияние на функцию печени у мышей. На фиг. 16D показано соответствующее влияние на количество тромбоцитов у мышей.

На фиг. 17 показано сравнение фармакокинетики биспецифических антител Ab10-A12V2-2 и Ab10-A297V3-2.

На фиг. 13А-17 значения Р рассчитывали относительно контроля hIgG1, если не указано иное. Использовался статистический метод t-критерия Стьюдента. ns означает отсутствие существенной разницы. * представляет собой $p < 0,05$, ** представляет собой p

< 0,01, *** представляет собой $p < 0,001$ и **** представляет собой $p < 0,0001$.

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, для которых не указаны конкретные источники, являются коммерчески доступными общепринятыми реагентами.

Пример 1. Скрининг и получение моноклональных антител к FAP

1.1. Последовательности и подготовка антигенов для скрининга и обнаружения

Белок активации фибробластов человека (FAP; GeneBank, регистрационный номер AAC51668) представляет собой сериновую олигопептидазу с молекулярной массой около 170 кДа и представляет собой гомодимер. Последовательности, источники и применения рекомбинантных белков FAP, используемых в настоящем изобретении, показаны в таблице 2.

Таблица 2. Источники аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков

Название	Начало и конец аминокислотной последовательности	Sino Biological кат. №	Применение
h-FAP-биотин (FAP человека)	Leu26-Asp760 (GeneBank, регистрационный номер № AAC51668)	10464-H07H-B	Жидкофазный магнитный скрининг гранул на фаговом дисплее
h-FAP-His		10464-H07H	Скрининг ELISA на наличие положительных клонов
h-FAP-FITC		10464-H07H-F	Скрининг дисплея антител на поверхности клеток CHO

1.2. Скрининг фрагментов h-FAP-специфических связывающих антител из естественной библиотеки фагового дисплея Fab человека

Используя антиген h-FAP-биотин в качестве молекулы-мишени, антигенспецифические фаги захватывали с помощью покрытых авидином магнитных шариков и проводили обогащение фагов с использованием магнитного штатива. Антигенспецифические фаги элюировали раствором глицина с pH 2,2.

После двух циклов скрининга 284 клон были случайным образом отобраны и подвергнуты скринингу с помощью фагового ELISA на наличие положительных клонов. Конкретные стадии заключаются в следующем: подсчитывали растущие колонии в чашке - всего было 284 колонии. Фаги инокулировали на 96-луночный планшет, каждая лунка которого содержала 400 мкл культуральной среды (2YT + Amp + 0,2% глюкозы). Планшет встряхивали при 37 °C при 250 об/мин в течение 6 часов. Планшет покрывали антигеном h-FAP-His при 100 нг/100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при 4 °C. На следующий день, после того, как 96-луночный планшет промывали и блокировали, в каждую лунку добавляли 100 мкл бактериальной жидкости, инкубированной в течение ночи, и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. После промывки добавляли вторичное антитело (меченное HRP антитело против IgG-Fab человека) (HRP – пероксидаза хрена) и планшет инкубировали при 37 °C в течение 40 мин. После промывки добавляли раствор субстрата и инкубировали планшет в темноте в течение 30 мин. Затем значения OD600 (оптическая плотность при 600 нм) измеряли на микропланшетном ридере. В общей сложности 122 положительных клон, полученных в результате двух циклов скрининга, секвенировали с получением 74 уникальных VH (составляющих библиотеку, обогащенную VH), 48 уникальных легких цепей к (составляющих библиотеку, обогащенную KLC) и 10 уникальных легких цепей λ (составляющих библиотеку, обогащенную LLC).

1.3. Конструирование дисплея библиотеки полноразмерных антител на поверхности клеток CHO

1) Конструирование генной библиотеки дисплея клеток CHO полноразмерного антитела, включающее следующие стадии: библиотеку, обогащенную VH, библиотеку, обогащенную KLC, и библиотеку, обогащенную LLC, подвергали PCR-амплификации (PCR - полимеразная цепная реакция) с тремя наборами праймеров, соответственно. Три обогащенные библиотеки расщепляли ферментами, а затем вставляли в соответствующие векторы компонентов для конструирования соответствующих библиотек компонентов. Библиотеки компонентов KLC, LLC и VH расщепляли ферментами. После расщепления библиотеки фрагментов KLC, LLC и VH анализировали и очищали с помощью электрофореза. Клеточный дисплей вектора полноразмерного антитела расщепляли

ферментом и фрагменты вектора очищали. Очищенные фрагменты вектора и библиотеки фрагментов KLC, LLC и VH смешивали и лигировали. Продукты лигирования очищали и переносили в клетки *E. coli* путем электропорации. Клетки высевали на чашку и культивировали в течение ночи при 37 °C, и колонии подсчитывали. Емкость библиотеки составила $3,6 \times 10^6$, что более чем в 800 раз превышает теоретическое разнообразие ($74 \times 58 = 4292$). Все колонии собирали, и векторную ДНК экстрагировали с получением геной библиотеки клеточного дисплея полноразмерного антитела.

2) Конструирование h-FAP-антиген-специфической клеточной библиотеки дисплея полноразмерного антитела, включающее следующие стадии: клетки СНО трансформировали векторной ДНК геной библиотеки клеточного дисплея полноразмерного антитела для конструирования библиотеки дисплея клеток СНО полноразмерного антитела. Клеточную библиотеку подвергали скринингу под давлением гигромицина. Получали стабильно трансформированную клеточную библиотеку, и клеточную библиотеку дважды окрашивали PE-меченным (PE - R-фикоэритрин) мышинным антителом к к (или λ) легкой цепи и FITC-меченным (FITC - флуоресцеин изотиоцианат) антигеном h-FAP и сортировали с помощью FACS (флуоресцентный сортинг) для PE и FITC двойных положительных клеток. Каждая лунка содержала одну клетку. Для сортировки библиотеки легкой цепи к использовали 2 96-луночных планшета, а для сортировки библиотеки легкой цепи λ использовали 1 96-луночный планшет. Клетки культивировали под давлением гигромицина.

3) Анализ FACS для идентификации одноклеточных клонов, демонстрирующих h-FAP-антиген-специфические антитела, включающий следующие стадии: Клетки культивировали под давлением гигромицина в течение 14 дней с получением 153 стабильно трансформированных к-цепочечных одноклеточных клонов и 50 λ -цепочечных одноклеточных клонов. Клетки расщепляли 0,5 mM буферным раствором EDTA-PBS (этилендиаминтетрауксусная кислота/фосфатно-солевой буферный раствор) (), и одноклеточные клоны дважды окрашивали PE-меченным мышинным антителом к к (или λ) легкой цепи человека и FITC-меченным антигеном h-FAP. Анализ FACS показал, что было получено 138 флуоресцентных двойных положительных одноклеточных клонов, меченых PE и FITC.

4) Клонирование генов антител, включающее следующие стадии: Положительные клоны анализировали на аффинность с помощью FACS, и было решено, что 45 клонов будут подвергнуты PCR-амплификации гена антитела. После центрифугирования собирали положительные клоны и отбрасывали супернатант. Геномную ДНК экстрагировали из клеток, и VH и LC амплифицировали с помощью PCR. Фрагменты, полученные в результате

амплификации, разделяли с помощью электрофореза и секвенировали, и идентифицировали 6 уникальных VH и 6 уникальных к-цепей. Их комбинации могут давать 12 клонов с уникальными последовательностями. Последовательности VH и VL 4 клонов показаны в таблице 3.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности VH и VL (к KLC) антител h-FAP

№	Аминокислотная последовательность	
Ab9	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQG FQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRS DDTAVYYCARD <u>ESLTARPYFYGF</u> DVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1)
	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYA <u>ASSLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANSE</u> <u>PPAFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:2)
Ab10	VH	QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGF QWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRS DDTAVYYCARD <u>ASLTARPYFYGF</u> DVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:3)
	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKL LIYA <u>ASSLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANSE</u> <u>PPAFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:4)
Ab14	VH	QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGF QWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRS DDTAVYYCARD <u>ASLTARPYFYGF</u> DVWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:5)
	VL	EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYA <u>ASSLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANSEFP</u> <u>LTFGGGTKVEIK</u> (SEQ ID NO:6)
Ab15	VH	QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQG FQWMGWINPNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRS DDTAVYYCARD <u>ESLTARPYFYGF</u> DVWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:7)
	VL	EIVLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKSL IYA <u>ASSLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQANSEFP</u>

		<u>PTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)</u>
--	--	-----------------------------------

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

Настоящее изобретение дополнительно относится к последовательностям полноразмерных тяжелых и легких цепей Ab9, Ab10, Ab14 и Ab15.

> Полноразмерная тяжелая цепь Ab9

QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDESLTARPYFYF
GFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLD
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 49)

> Полноразмерная легкая цепь Ab9

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSL
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 50)

> Полноразмерная тяжелая цепь Ab10

QVQLQSQGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYFYG
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)

> Полноразмерная легкая цепь Ab10

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSL
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52)

> Полноразмерная тяжелая цепь Ab14

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
 NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYME~~LT~~SLRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYG
 FDVWGQGT~~LVTVSS~~ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

> Полноразмерная легкая цепь Ab14

EIVLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 54)

> Полноразмерная тяжелая цепь Ab15

QMQLVQSGAEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWIN
 PNRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYME~~LT~~SLRSDDTAVYYCARDES~~LT~~ARPYFY
 GFDVWGQGT~~LVTVSS~~ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 55)

> Полноразмерная легкая цепь Ab15

EIVLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKSLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 TLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 56)

Таблица 4. CDR антител к FAP

№	CDR VH		CDR VL	
Ab9	HCDR1	DHFIH (SEQ ID NO: 9)	LCDR1	RASQGISSWLA (SEQ ID NO:12)
	HCDR2	WINPNRGVTHHAQDFQG (SEQ ID NO:10)	LCDR2	AASSLQ (SEQ ID NO:13)

	HCDR3	DESLTARPYFYGFDV (SEQ ID NO:11)	LCDR3	QQANSFPPA (SEQ ID NO:14)
Ab10	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	DASLTARPYFYGFDV (SEQ ID NO:15)	LCDR3	SEQ ID NO:14
Ab14	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	SEQ ID NO:15	LCDR3	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 16)
Ab15	HCDR1	SEQ ID NO:9	LCDR1	SEQ ID NO:12
	HCDR2	SEQ ID NO:10	LCDR2	SEQ ID NO:13
	HCDR3	SEQ ID NO:11	LCDR3	QQANSFPPT (SEQ ID NO:17)

То есть вышеуказанные антитела к FAP имеют следующую общую структуру:

их HCDR1 представляют собой SEQ ID NO: 9;

их HCDR2 представляют собой SEQ ID NO: 10;

их HCDR3 представляют собой DX_1 SLTARPYFYGFDV (SEQ ID NO: 18), где X_1 представляет собой E или A;

их LCDR1 все представляют собой SEQ ID NO: 12;

их LCDR2 все представляют собой SEQ ID NO: 13;

их LCDR3 все представляют собой QQANSFPX₂X₃ (SEQ ID NO: 19), где X_2 представляет собой P или L, а X_3 представляет собой A или T.

1.4. Конструирование дисплея библиотеки полноразмерных антител на поверхности клеток CHO

1) Конструирование растворимого вектора экспрессии антитела, включающее следующие стадии: Положительные фрагменты VH и LC с уникальными последовательностями расщепляли ферментами и очищали. Фрагменты VH вставляли в растворимый вектор экспрессии тяжелой цепи (IgG1), а фрагменты LC вставляли в растворимый вектор экспрессии легкой цепи. Колонии отправляли на секвенирование и экстрагировали ДНК.

2) Экспрессия и очистка растворимых антител, включающая следующие стадии: Клетки Expi293 размножали суспензионной культурой. В соответствии с парами легкая-тяжелая цепь, определенными выше, смешивали 18 мкг вектора экспрессии легкой цепи и

12 мкг вектора экспрессии тяжелой цепи. Векторную ДНК и PEI (полиэтиленимин) смешивали в массовом соотношении 1:2,5 и использовали смесь для трансформации клеток Expi293. На 6-й день собирали супернатант культуры и очищали антитела способом на основе белка А. SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в денатурирующем геле показал, что чистота антител достигла более 90%. Антитела хранили при -80 °С.

1.5. Анализ связывания ELISA

Рекомбинантный белок FAP с His-меткой непосредственно использовали для покрытия. После добавления антител добавляли вторичное антитело (HRP-конъюгированное антитело к IgG человека) и субстрат HRP TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) для измерения активности связывания антител с антигеном. Анализ включает следующие этапы: раствор 0,5 мкг/мл белка FAP-His человека использовали для покрытия 96-луночного микропланшета при 100 мкл/лунку, и планшет инкубировали в течение ночи при 4 °С. После тщательной промывки добавляли блокирующий раствор при 200 мкл/лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После тщательной промывки добавляли разведения тестируемых антител против FAP при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После тщательной промывки добавляли разведение 1:20 000 меченого HRP козьего вторичного антитела к IgG человека при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После тщательной промывки добавляли TMB при 100 мкл/лунку, и планшет инкубировали в темноте в течение 15 мин. Добавляли 0,16 М серную кислоту при 50 мкл/лунку. Значение OD при 450 нм измеряли на микропланшетном ридере Thermo MultiSkanFc и рассчитывали значения EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация,) связывания антител к FAP. Результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Значения EC₅₀ аффинности связывания антител к FAP с антигеном FAP человека

№	EC ₅₀ (мг/мл)
Ab9	0,1014
Ab10	0,0920
Ab14	0,4168
Ab15	0,3206

1.6. Анализ связывания поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

В качестве подвижной фазы использовали сенсорную микросхему CM5 и буферный

раствор HBS-EP + (10 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества P20). Антитело против IgG (Fc) человека превращали в раствор 30 мкг/мл в 10 mM буферном растворе ацетата натрия (pH 5,0) и иммобилизовали аминосвязыванием. Испытуемые антитела разбавляли в буферном растворе HBS-EP + и захватывали антителом к IgG (Fc) человека на каналах чипа. h-FAP-His растворяли в буферном растворе HBS-EP + для получения анализируемого вещества, и анализируемое вещество последовательно разбавляли в 2 раза. Разбавленные антитела пропускали через экспериментальный и эталонный каналы со скоростью потока 30 мкл/мин с 1 мин связывания и 15 мин диссоциации. 10 mM глицина pH 1,5 пропускали в виде буферного раствора для регенерации в течение 30 секунд со скоростью потока 10 мкл/мин. Данные анализировали. Результаты в таблице 6 показывают, что аффинность Ab9, Ab10, Ab14 и Ab15 к антигену FAP в 3-6 раз выше, чем у контрольного антитела против FAP 28H1 (последовательности 219 и 233 патента US9266938B2), и аффинность Ab15 является самой высокой, с K_D $2,15 \times 10^{-10}$. Однако аффинности связывания других антител к FAP, полученных путем скрининга одновременно в настоящем изобретении, таких как Ab2, Ab4 и Ab5 (последовательности не показаны), для антигена ниже, чем у 28H1.

Таблица 6. Значения аффинности SPR K_a , K_d и K_D антител к FAP

№	k_a (1/Мс)	k_d (константа скорости диссоциации) (1/с)	K_D (М)	Соотношение K_D 28H1 к K_D исследуемого антитела	Соотношение K_d 28H1 к K_d исследуемого антитела
28H1	1,95E+05	2,55E-04	1,31E-09	1	1
Ab2	1,62E+06	1,62E-02	9,98E-09	0,1	0,02
Ab4	1,51E+06	6,17E-03	4,09E-09	0,3	0,04
Ab5	1,08E+06	3,57E-03	3,32E-09	0,4	0,07
Ab9	2,35E+05	7,19E-05	3,06E-10	4,3	3,54
Ab10	2,97E+05	7,28E-05	2,45E-10	5,3	3,50
Ab14	3,32E+05	1,21E-04	3,65E-10	3,6	2,10
Ab15	4,88E+05	1,05E-04	2,15E-10	6,1	2,43

Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи контрольного антитела 28H1 являются следующими:

> VH 28H1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWAS
GEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFYWGQGT
LTVVSS (SEQ ID NO: 20)

> VL 28H1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRAT
GIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 21)

1.7. Анализ связывания FACS

Анализ FACS использовали для измерения связывающих свойств антител к FAP на клетках. Анализ включает следующие этапы: Была сконструирована и высеяна клеточная линия CHO, сверхэкспрессирующая FAP человека (1E5/лунку). Тестируемые антитела добавляли по 100 мкл/лунку. Самая высокая концентрация составляла 100 нМ. Проводили 5-кратное разведение, получая в общей сложности 8 концентраций. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Антитело к hIgG Alexa Fluor-647 добавляли в качестве вторичного антитела в соотношении 1:500. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 30 мин и проводили анализ FACS. Антитела, которые связываются с FAP, могут маркировать клетки. Соотношение между процентом меченых клеток, которые сверхэкспрессируют FAP человека среди всех клеток, и концентрацией антитела показано на фиг. 1. Значения связывания EC₅₀ антител с FAP человека показаны в таблице 7. Соотношение между процентом меченых клеток, которые сверхэкспрессируют FAP мыши среди всех клеток, и концентрацией антитела показано на фиг. 2.

Таблица 7. Значения EC₅₀ аффинности связывания антител к FAP с антигеном FAP человека

№ антитела	EC ₅₀ (мкг/мл)
28H1	0,0007839
Ab9	0,0003684
Ab10	0,0004320
Ab14	0,0004738
Ab15	0,0004858
Изотип (NC)	-

Пример 2. Скрининг и получение наноантител к CD40 (VHH)

2.1. Последовательности и подготовка иммунизирующих и скрининговых антигенов
Выбирали рекомбинантный белок CD40 человека, меченный His (гистидин) (h-

CD40-His), рекомбинантный белок CD40 человека, меченный биотином, на С-конце (h-CD40-биотин) и рекомбинантный белок CD40 обезьяны, меченный гистидином, на С-конце (syno-CD40-His). Их последовательности и источники приведены в таблице 8. Белковые реагенты можно использовать в экспериментах следующих примеров.

Таблица 8. Аминокислотные последовательности и источники рекомбинантных белков

Название	Начало и конец аминокислотной последовательности	Acrobiosystems кат. №
h-CD40-His	Glu21-Arg193	CD0-H5228
h-CD40-биотин		CD0-H82E8
syno-CD40-His		CD0-C52H6

2.2. Процесс иммунизации альпаки и измерение титра

h-CD40-his использовали для иммунизации альпаки. Иммунизацию проводили один раз каждые две недели, и в общей сложности проводили четыре иммунизации. При первой иммунизации 0,5 мг антигена и 1 мл полного адьюванта Фрейнда (CFA) смешивали и вводили подкожно, а при следующих трех иммунизациях 0,25 мг антигена и 1 мл неполного адьюванта Фрейнда (IFA) смешивали и вводили подкожно. Холостую сыворотку собирали перед иммунизацией. Через неделю после третьей иммунизации и через неделю после четвертой иммунизации собирали 50 мл периферической крови и отделяли лимфоциты. Измеряли титр сыворотки.

2.3. Измерение титра и построение фаговой библиотеки

После четырех иммунизаций альпаки измеряли титр сыворотки. После того, как измерение показало, что титр был приемлемым, РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) разделяли и экстрагировали общую РНК. Измеряли чистоту, и РНК обратно транскрибировали в ДНК. После двух циклов вложенной ПЦР очищенный вектор и представляющий интерес фрагмент VHH расщепляли ферментами и лигировали. Трансфекцию проводили с использованием электропорации и отбирали клоны с получением фаговой библиотеки А и фаговой библиотеки В.

2.4. Пэннинг аффинности фаговых библиотек и идентификация по ELISA

Используя антиген h-CD40 в качестве молекулы-мишени, проводили скрининг с использованием метода элюирования кислоты Gly-HCL для элюирования специфических фагов. После двух циклов скрининга 384 клон были случайным образом отобраны из

планшетов для измерения титра первого и второго циклов и подвергнуты скринингу с помощью фагового ELISA на наличие положительных клонов, и была измерена оптическая плотность при 450 нм. Согласно результатам секвенирования, последовательности подвергали выравниванию последовательностей и анализу эволюционного дерева, и 16 последовательностей получали путем скрининга. Среди них аминокислотные последовательности двух лучше функционирующих антител к CD40 показаны в таблице 9 и таблице 10.

Таблица 9. Последовательности однодоменных антител к CD40

№	Аминокислотная последовательность
A12	EVQVVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>NYGMKW</u> VRQAPGKGP EWVST <u>TILSQGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTA LYYCLRV <u>VDWSDYSP</u> RGQGTQVTVSA (SEQ ID NO:22)
A297	QVQLVESGGGMVEPGGSLRLSCAASGFTFS <u>RYGMKW</u> VRQAPGKGPE WVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNAQNTVYLQMNSLKPEDTAL YYCLR <u>IDYSDYSS</u> RGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:23)

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

Таблица 10. CDR антител к CD40

№	Последовательности CDR	
Ab12	CDR1	NYGMK (SEQ ID NO:24)
	CDR2	TILSQGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:25)
	CDR3	VDWSDYSP (SEQ ID NO:26)
Ab297	CDR1	RYGMK (SEQ ID NO:27)
	CDR2	TINSHGDTTYADSVKG (SEQ ID NO:28)
	CDR3	IDYSDYSS (SEQ ID NO:29)

2.5 Экспрессия и очистка слитых белков однодоменного антитела-Fc к CD40

Вышеуказанные 2 VHH отдельно лигировали с IgG1-Fc человека, содержащим мутацию N297A. Последовательности полученных слитых белков VHH-Fc показаны в таблице 11. IgG1-Fc человека подчеркнут, а мутация N297A выделена жирным шрифтом.

9E5-SELFNS использовали в качестве агониста CD40 положительного контроля (см.

последовательности 58 и 59 в WO2020108611A1).

Таблица 11. Последовательности слитых белков, полученных из однодоменных антител к CD40 и IgG1-Fc человека

№	Аминокислотная последовательность
A12-Fc	EVQVVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGK GPEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKP EDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSAEPKSADKTHTCPPCPA <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u> <u>CLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 30)
A297-Fc	QVQLVESGGGMVEPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKG PEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNANQNTVYLQMNSLKP DTALYYCLRIDYSDYSSRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPE <u>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC</u> <u>LVKGFIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV</u> <u>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 31)

Плазмиды конструировали и использовали для временной трансфекции клеток, а антитела экспрессировали и очищали. Анализ показал, что антитела, представляющие интерес, были получены.

2.6. Анализ связывания FACS

Анализ FACS использовали для измерения связывающих свойств антител к CD40 на клетках. Анализ включает следующие стадии: получали и высевали одиночные клетки Raji. Тестируемые антитела добавляли по 100 мкл/лунку. Точка самой высокой концентрации составляла 100 нМ. Проводили 5-кратное разведение, получая в общей сложности 8 точек концентрации. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Антитело к hIgG Alexa Fluor-647 добавляли в качестве вторичного антитела в соотношении 1:500. Планшет инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Проводили анализ FACS. Агонист CD40 использовали в качестве положительного контроля. Значения EC₅₀ антител показаны на фиг.

3 и в таблице 12.

Таблица 12. Значения EC_{50} аффинности связывания антител к CD40 с антигеном CD40 человека

№	EC_{50} (нМ)
A12	0,3657
A297	0,5293
9E5-SELFNS	0,1961

Для агонистического антитела к CD40, используемого в биспецифическом антителе к FAP/CD40, его аффинность EC_{50} к CD40 не должна быть слишком высокой; в противном случае биспецифическое антитело будет предпочтительно связываться с CD40. Более желательно, чтобы биспецифическое антитело предпочтительно связывалось с FAP, тем самым играя определенную роль. Таким образом, A12 и A297 имеют преимущества, которые в большей степени соответствуют вышеуказанным характеристикам. Это также отражено в таблице 13.

2.7. Измерение активности наноантител к CD40

Измеряли активацию клеток репортерного гена CD40 антителами к CD40 и оценивали агонистическую активность антител к CD40 в соответствии с EC_{50} . Измерение включает следующие этапы: клетки HEK-BlueTMCD40L (приобретенные у Invivogen Cat# hkb-cd40, стабильно трансфицированные геном CD40 человека и геномом SEAP, опосредованным NF-κB; уровень активации сигнального пути CD40 можно охарактеризовать путем измерения количества SEAP, секретируемого в супернатанте, с использованием субстрата SEAP QUANTI-Blue). Культуральная среда представляла собой DMEM, содержащую 10% FBS, 100 мкг/мл нормоцина, 100 мкг/мл зеоцина и 30 пг/мл бластицидина. Клетки высевали на 96-луночный планшет при 5E4/лунку. Культуральная среда представляла собой DMEM, содержащая 10% FBS и 100 мкг/мл нормоцина. Клетки культивировали в течение ночи. После клеточной адгезии последовательно разбавленные тестируемые антитела добавляли при 100 мкл/лунку и клетки культивировали в течение ночи при 37 °C. Клетки центрифугировали. Клеточный супернатант переносили в новый 96-луночный планшет и добавляли 180 мкл раствора субстрата QUANTI-Blue. Планшет инкубировали в темноте в течение 15 мин. Поглощение при 620 нм измеряли на считывающем устройстве для микропланшетов Envision и рассчитывали значения EC_{50} . Агонист CD40 (9E5-SELFNS) использовали в качестве положительного контроля. EC_{50} для соотношения между процентом относительной активности агониста (по сравнению с 200

нМ 9E5-SELFNS) и концентрацией антитела показан на фиг. 4 и в таблице 13.

Таблица 13. Значения EC₅₀ агонистической активности антител к CD40 и процент их активирующей активности (%) относительно положительного контроля

№	EC ₅₀ (нМ)	Максимальный ответ (процент относительно 200 нМ 9E5-SELFNS)
A12	0,231	51,76
A297	0,556	84,15
9E5-SELFNS	0,466	102,55
IgG1	Активация отсутствует	Активация отсутствует

2.8. Гуманизация наноантител к CD40

Согласно вышеуказанным результатам, A12 и A297 были гуманизированы. На основе типичных структур VHH полученных наноантител A12 и A297 последовательности варибельной области VHH сравнивали с базой данных зародышевой линии антител для получения высоко гомологичных матриц зародышевой линии человека. Предпочтительными матрицами зародышевой линии человека для антител A12 и A297 в настоящем документе являются IGHV3-48*03. Затем CDR прививали в FR человека, и ключевые аминокислоты, которые влияют на структуры и функции антител, подвергали обратной мутации для восстановления связывания и активности. Гуманизированные последовательности показаны в таблице 14.

Таблица 14. Последовательности гуманизированных антител к CD40

Название		Аминокислотная последовательность
A12	V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMK W VRQAPGK GLEWVSTILSQGGSTYYADSVK G RFTISRDN A KNSLYLQMN S LR AEDTALYYCARVDWSDYSPRGQGT M TVSS(SEQ ID NO: 32)
	V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMK W VRQAPGK GLEWVSTILSQGGSTYYADSVK G RFTISRDN A KNSLYLQMN S LR AEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGT Q VTVSS(SEQ ID NO: 33)
	V3	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMK W VRQAPGK GLEWVSTILSQGGSTYYADSVK G RFTISRDN S KNTLYLQMN S LR AEDTAVYYCLRVDWSDYSPRGQGT Q VTVSS(SEQ ID NO: 34)

A297	V1	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCARIDYSSRGQGMVTVSS(SEQ ID NO: 35)
	V2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCLRIDYSSRGQGMVTVSS(SEQ ID NO: 36)
	V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCLRIDYSSRGQGLTVTVSS(SEQ ID NO: 37)
	V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCLKIDYSSRGQGLTVTVSS(SEQ ID NO: 38)

То есть наноантитела к CD40 по настоящему изобретению имеют следующую общую структуру:

их CDR1 представляют собой X₄YGMK (SEQ ID NO: 39), где X₄ представляет собой N или R;

их CDR2 представляют собой TIX₅SX₆GX₇X₈TYADSVKG (SEQ ID NO: 40), где X₅ представляет собой N или L; X₆ представляет собой Q или H; X₇ представляет собой G или D; X₈ представляет собой S или T;

их CDR3 представляют собой X₉D X₁₀SDYSX₁₁ (SEQ ID NO: 41), где X₉ представляет собой V или I; X₁₀ представляет собой W или Y; X₁₁ представляет собой P или S.

Вышеуказанные 7 VHH отдельно лигировали с IgG1-Fc человека, содержащим мутации S267E/L328F (пронумерованные в соответствии с EU). Последовательности полученных слитых белков VHH-Fc показаны в таблице 15. IgG1-Fc человека подчеркнут, а мутации S267E/L328F выделены жирным шрифтом.

Таблица 15. Последовательности слитых белков, полученных из гуманизированных однодоменных антител к CD40 и IgG1-Fc человека (S267E/L328F)

№	Аминокислотная последовательность
A12V1-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPG KGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCARVDWSDYSPRGQGMVTVSSEPKSADKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE

	<p><u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>(SEQ ID NO: 57)</p>
A12V2-Fc	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPG KGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>(SEQ ID NO: 58)</p>
A12V3-Fc	<p>EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPG KGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>(SEQ ID NO: 59)</p>
A297V1-Fc	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPG KGLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCARIDYSDYSSRGQGTMTVTSSEPKSADKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u>(SEQ ID NO: 60)</p>
A297V2-Fc	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPG KGLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS</p>

	<u>LRAEDTALYYCLRIDYSDYSSRGQGMVTVSSEPKSADKTHTCP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE</u> <u>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG</u> <u>SFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP</u> <u>GK</u> (SEQ ID NO: 61)
A297V3-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGLVTVSSEPKSADKTHTCP <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEV</u> <u>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> <u>K</u> (SEQ ID NO: 62)
A297V4-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGK GLEWVSTINSHGDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCLKIDYSDYSSRGQGLVTVSSEPKSADKTHTCP <u>PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN</u> <u>GKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 63)

Вышеуказанные 7 VHH-Fc использовали для временной трансфекции клеток, а антитела экспрессировали и очищали. Анализ показал, что белки антител, представляющие интерес, были получены.

2.9. Аффинность гуманизированных антител к CD40 к высокоэкспрессирующему штамму клеток CD40

Способность гуманизированных антител связываться с клетками, высоко экспрессирующими белок CD40 антигена человека, измеряли с помощью FACS. Клетки HEK293 временно трансфицировали плазмидами CD40 (CD40 кДНК ORF Clone, Human, C-DYKDDDK (Flag®) Tag; Sino Biological; HG10774-CF) с получением клеток HEK293,

высоко экспрессирующих CD40. Полученные клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS) и добавляли тестируемые антитела, которые последовательно разбавляли до различных концентраций. После 1 часа инкубации на льду клетки промывали PBS и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин. Козье антитело к Fc человека, меченное флуоресцентной группой Alexa Fluor 647, добавляли в качестве вторичного антитела и окрашивали клетки на ледяной бане в течение 1 часа. После двух промывок PBS флуоресцентные сигналы на поверхности клетки обнаруживали с помощью FACS. Результаты показаны на фиг. 5A и 5B, а значения EC₅₀ показаны в таблице 16. Все гуманизированные антитела по настоящему изобретению обладают относительно высоким сродством к высокоэкспрессирующему штамму клеток CD40.

Таблица 16. Значения EC₅₀ аффинности гуманизированных антител к CD40 к высокоэкспрессирующему CD40 штамму клеток человека

Антитело	EC ₅₀ (нМ)	Емакс MFI (средняя интенсивность флуоресценции)
A12	1,09	17256
A12_V1	2,13	16608
A12_V2	0,42	16609
A12_V3	1,74	16909
A297	1,12	16728
A297_V1	1,11	7300
A297_V2	1,07	12764
A297_V3	1,25	12827
A297_V4	2,70	8255
9E5-SELFNS	1,12	12120

2.10. Активация клеток HEK-BlueTM CD40L гуманизированными антителами к CD40

Агонистическую активность антител к CD40 *in vitro* оценивали путем измерения активации клеток HEK-BlueTMCD40L антителами к CD40 при перекрестном сшивании с помощью FcγRIIb. Fc гуманизированных антител CD40 содержит мутации S267E/L328F. Мутации усиливают аффинность Fc IgG1 к FcγRIIb, тем самым усиливая перекрестное сшивание антител FcγRIIb. FcγRIIb-опосредованная активация клеток HEK-BlueTMCD40L

антителами к CD40 имитирует агонистическую активность антител к CD40 при полном перекрестном сшивании. Клетки HEK293 временно трансфицировали плазмидами Fc γ RIIb (CD32B/Fcgr2b кДНК ORF Clone, Human, N-His tag; Sino Biological; HG10259-NH) с получением клеток HEK293, высоко экспрессирующих Fc γ RIIb. Клетки HEK-BlueTMCD40L высевали на 96-луночный планшет для культивирования клеток при 5Е4/лунку (культуральная среда представляла собой DMEM, 10% FBS, 100 мкг/мл нормоцина), и клетки HEK293, экспрессирующие Fc γ RIIb, добавляли при 5Е4/лунку. Последовательно разбавленные тестируемые антитела добавляли при 100 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение ночи при 37 °С. Клетки центрифугировали. 20 мкл клеточного супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет и добавляли 180 мкл раствора субстрата QUANTI-Blue. Планшет инкубировали в темноте в течение 30 мин. Поглощение при 620 нм измеряли на микропланшетном ридере Envision и рассчитывали значения EC₅₀ и значения E_{max} (относительно интенсивности флуоресценции в группе, не содержащей антител). Для оценки клеточной агонистической активности антител к CD40 *in vitro* использовали значения EC₅₀.

Fc γ RIIb-опосредованная активация клеток HEK-BlueTMCD40L антителами к CD40 показана на фиг. 6А и 6В. Значения EC₅₀ и значения E_{max} (относительная интенсивность флуоресценции) показаны в таблице 17.

Результаты показывают, что в тех случаях, когда гуманизированные антитела к CD40 были перекрестно сшиты Fc γ RIIb, все гуманизированные антитела к CD40 обладают относительно сильной агонистической активностью в системе репортерных генов, описанной выше.

Таблица 17. Активация клеток HEK-BlueTMCD40L гуманизированными антителами к CD40

Антитело	Fc γ RIIb-опосредованная активация клеток HEK-Blue TM CD40L	
	EC ₅₀ (нМ)	E _{max} (относительная интенсивность флуоресценции)
A12	0,231	9,68
A12_V1	0,009	21,61
A12_V2	0,002	18,57
A12_V3	0,011	19,08

A297	0,243	17,34
A297-V1	0,021	18,37
A297-V2	0,005	19,99
A297_V3	0,006	12,84
A297_V4	0,038	13,31
9E5-SELFNS	0,009	16,05

Пример 3. Конструирование и получение биспецифических антител к FAP/CD40

3.1. Конструирование, экспрессия и очистка биспецифических антител к FAP/CD40

Согласно результатам скрининга гуманизированных антител к CD40, были выбраны A12V2 и A297V3. Согласно результатам скрининга антител к FAP, был выбран Ab10. Выбранные антитела использовали для конструирования биспецифических антител к FAP/CD40. Ab10 использовали в качестве каркаса IgG для биспецифических антител, и каждый из С-концов двух тяжелых цепей Ab10 был связан с 1 наноантителом к CD40 или 2 или 3 наноантителами к CD40 в тандеме. Линкеры, используемые между наноантителами к CD40 и линкерами, используемыми для связывания с С-концами тяжелых цепей Ab10, представляли собой «GGGSGGGGS». Каждое из биспецифических антител содержит двухвалентные, четырехвалентные и шестивалентные наноантитела CD40, как показано на фиг. 7. В названиях антител, например, Ab10-A12V2-2, Ab10 представляет собой то, что было использовано антитело к FAP, A12V2 представляет собой то, что было использовано гуманизированное антитело к CD40, а «2» в конце представляет собой то, что CD40 был двухвалентным. Все другие антитела названы таким образом. Транзиторную трансфекцию и экспрессию и очистку антител проводили с использованием способов, описанных в разделе 2.5 примера 2. Анализ показал, что молекулы биспецифических антител, представляющие интерес, были получены. Аминокислотные последовательности молекул биспецифического антитела являются следующими:

> Тяжелая цепь Ab10-A12V2-2

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTNHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYME¹SLRSDDTAVYYCARDASLTARPY²YFYG
FDVWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV³PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK⁴TPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV⁵FSCSV⁶MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQQGST
YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVS
S (SEQ ID NO: 42)

> Легкая цепь Ab10-A12V2-2

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPAFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFVPEAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 43)

> Тяжелая цепь Ab10-A12V2-4

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYFG
FDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQQGST
YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVS
SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLE
WVSTILSQQGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYS
PRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 44)

> Тяжелая цепь Ab10-A12V2-6

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYFG
FDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLEWVSTILSQQGST
YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYSPRGQGTQVTVS
SGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKWVRQAPGKGLE
WVSTILSQQGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCLRVDWSDYS

PRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMKW
VRQAPGKGLEWVSTILSQGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALY
CLRVDWSDYSPRGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 45)

> Тяжелая цепь Ab10-A297V3-2

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYG
FDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTT
YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTTLVTVSS
(SEQ ID NO: 46)

> Тяжелая цепь Ab10-A297V3-4

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYG
FDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGS
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTT
YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGTTLVTVSS
GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEW
VSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSR
GQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 47)

> Тяжелая цепь Ab10-A297V3-6

QVQLQQSGVEVKKPGASVTVSCRASGYSFADHFIHWVRQAPGQGFQWMGWINP
NRGVTHHAQDFQGRVAMTRDMSTDTVYMELTSLSRSDDTAVYYCARDASLTARPYFYG
FDVWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN VFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGS
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEWVSTINSHGDTT
 YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSRGQGLTVTVSS
 GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVRQAPGKGLEW
 VSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCLRIDYSDYSSR
 GQGLTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMKWVR
 QAPGKGLEWVSTINSHGDTTYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCL
 RIDYSDYSSRGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 48)

Все легкие цепи Ab10-A12V2-4, Ab10-A12V2-6, Ab10-A297V3-2, Ab10-A297V3-4 и Ab10-A297V3-6 представляют собой SEQ ID NO: 43.

Примечание: области CH1 и Fc в тяжелых цепях подчеркнуты; области CL в легких цепях подчеркнуты; линкеры выделены курсивом; LALA (мутации L234A и L235A) выделен жирным шрифтом.

3.2. Измерение антигенсвязывающей аффинности биспецифических антител к FAP/CD40

Аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 к их антигенам, белку FAP человека (Acro, FAP-H5244) и белку CD40 человека (Acro, CD0-H5228), измеряли с помощью SPR (GE Healthcare; Biacore 8K). В качестве подвижной фазы использовали сенсорную микросхему CM5 и буферный раствор HBS-EP + (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества P20). Антитело к IgG (Fc) человека иммобилизовали аминсвязыванием. Испытуемые антитела отдельно разбавляли в буферном растворе HBS-EP + в качестве лигандов и захватывали антителом к IgG (Fc) человека на каналах чипа. В качестве аналитов использовали антигенные белки разных видов. Результаты показаны в таблицах 18 и 19. Результаты показывают, что полученные биспецифические антитела обычно могут связываться с FAP, и поскольку их аффинность к CD40 ниже, они предпочтительно связываются с FAP, тем самым играя определенную роль.

Таблица 18. Аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 к FAP человека

Антитело	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD (M)
Ab10	2,17E+05	7,39E-05	3,40E-10
Ab10-A12V2-4	1,75E+05	5,14E-05	2,94E-10
Ab10-A297V3-2	2,03E+05	8,22E-05	4,05E-10

Ab10-A297V3-4	1,84E+05	6,96E-05	3,78E-10
---------------	----------	----------	----------

Таблица 19. Аффинность биспецифических антител к FAP/CD40 к CD40 человека

Антитело	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (М)
9E5-SELFNS	6,04E+06	6,70E-03	1,11E-09
Ab10-A12V2-4	6,90E+04	2,00E-03	2,90E-08
Ab10-A297V3-2	2,09E+05	2,94E-02	1,41E-07
Ab10-A297V3-4	5,24E+05	1,37E-01	2,62E-07

3.3. Измерение аффинности биспецифических антител к FAP/CD40 к высокоэкспрессирующим FAP штаммам клеток

В этом эксперименте связывание биспецифических антител к FAP/CD40 со стабильно трансфицированными штаммами клеток CHOК1, которые высоко экспрессируют FAP человека, FAP яванского макака и FAP мыши, измеряли с помощью FACS. Было показано, что биспецифические антитела связываются с антигенами FAP на поверхности клеток человека, мыши и яванского макака, и их связывающие способности аналогичны способностям mAb. См. фиг. 8А-8С. Значения EC₅₀ приведены в таблице 20.

Таблица 20. Значения EC₅₀ для связывания биспецифических антител к FAP/CD40 с антигенами FAP на поверхности клеток человека и мыши

Антитело	FAP человека		Мышиный FAP		FAP яванского макака	
	EC ₅₀ (нМ)	Емакс (MFI)	EC ₅₀ (нМ)	Емакс (MFI)	EC ₅₀ (нМ)	Емакс (MFI)
Ab10-A12V2-2	2,72	74010	4,32	19541	5,65	44985
Ab10-A12V2-4	2,57	64905	4,43	18967	2,26	43150
Ab10-A297V3-2	2,51	65204	0,79	12633	1,09	28178
Ab10-A297V3-4	1,57	53835	1,65	12747	1,35	32480
Ab10	1,41	71968	10,41	26381	7,34	64618

3.4. Измерение аффинности биспецифических антител к FAP/CD40 к высокоэкспрессирующим CD40 штаммам клеток

Связывание биспецифических антител с CD40 клеточной поверхности измеряли с помощью FACS, включая клетки HEK-Blue™CD40L, высокоэкспрессирующие CD40 человека (Invivogen, кат. № hkb-cd40), и клетки HEK293, которые временно

трансфицировали плазмидами CD40 яванского макака (Sino Biological, кат. № CG90970-UT) и, таким образом, получали высокоэкспрессирующий CD40 яванского макака. Результаты показывают, что биспецифические антитела могут связываться с CD40 на поверхностях клеточных мембран человека и яванского макака. См. фиг. 9А, 9В и 11 и таблицу 21 для получения подробной информации.

Таблица 21. Значения EC_{50} для связывания биспецифических антител с антигеном CD40 на поверхности клетки человека

Антитело	CD40 человека		CD40 яванского макака	
	EC_{50} (нМ)	Емакс (MFI)	EC_{50} (нМ)	Емакс (MFI)
Ab10-A12V2-2	2,40	7570	2,76	6614
Ab10-A12V2-4	0,79	4635	3,24	6545
Ab10-A297V3-2	1,66	6254	1,31	4927
Ab10-A297V3-4	0,94	5085	0,88	5124

3.5. Измерение FAP-зависимой активности, способствующей созреванию DC, гуманизированных биспецифических антител к FAP/CD40

Для подтверждения влияния биспецифических антител к FAP/CD40 на созревание дендритных клеток моноциты выделяли из свежих PBMC с использованием CD14-положительных магнитных гранул и культивировали в среде 1640, содержащей 50 нг/мл GM-CSF и 50 нг/мл hIL-4, в течение 5 дней. Замену половины среды проводили каждые 2-3 дня. На 5-й день дендритные клетки, полученные индукцией, добавляли в 96-луночный планшет с плотностью $1E5$ клеток/луночку, и отдельно добавляли клетки CHOK1 в логарифмической фазе роста и клетки CHOK1, сверхэкспрессирующие FAP человека. Между тем, добавляли серийно разбавленные тестируемые антитела с 1 мкг/мл LPS (липосахарид) в качестве положительного контроля и 100 нМ hIgG1 и группу, не содержащую антитела, в качестве отрицательного контроля. Через 48 ч культивирования экспрессию молекул CD83 на поверхностях дендритных клеток измеряли с помощью FACS.

Результаты на фиг. 11 (в отсутствие CHOK1/FAP) и фиг. 12 (в присутствии CHOK1/FAP) показывают, что двухвалентные молекулы Ab10-A12V2-2 и Ab10-A297V3-2 не могут активировать DC в отсутствие CHOK1/FAP: их агонистическая активность CD40 полностью зависит от опосредованного FAP перекрестного сшивания. Однако четырехвалентные молекулы Ab10-A12V2-4 и Ab10-A297V3-4 могут индуцировать созревание клеток DC в отсутствие клеток CHOK1/FAP, и активация DC клеток может быть

дополнительно усилена в присутствии клеток CHOK1/FAP. Таким образом, FAP, экспрессируемый на поверхностях дендритных клеток, может обеспечить окно активации для биспецифических антител, будь то двухвалентных или четырехвалентных.

Пример 4. Эффективность *in vivo* биспецифических антител к FAP/CD40 Ab10-A297V3-2/4 у мышей

Гуманизированные мыши B-hCD40 были от Biocytogen Jiangsu Co., Ltd. (вид: *Mus musculus*; штамм: C57BL/6; самка). Клетки MC38 колоректальной карциномы мыши трансфицировали полноразмерными FAP-плазмидами мыши для конструирования стабильно трансфицированного штамма. Клетки штамма подкожно инокулировали в правые подмышечные впадины мышей при 5×10^5 клеток/0,1 мл/мышь. Когда средний объем опухоли вырос до 80-100 мм³, мышей с соответствующим индивидуальным объемом опухоли отбирали и рандомизировали в группы по 6. Мышам вводили внутривентально два раза в неделю. Через 48 часов после первого введения отбирали образцы периферической крови и анализировали на количество В-клеток и экспрессию CD86 на клеточной поверхности. На 8 день после группировки измеряли концентрации аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST). Введение было прекращено после четырех введений. Когда в контрольной группе hIgG1 были мыши с объемом опухоли более 2000 мм³, выполняли последнее введение. Через 24 ч после последнего введения проводили общий анализ крови.

4.1. Эффективность и токсичность однократной дозы *in-vivo* Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 у мышей

Противоопухолевую активность Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 сравнивали с активностью агониста CD40 mAb 9E5-mIgG1 в условиях однократной дозы. 9E5-mIgG1 и 9E5-SELFNS имеют одинаковую вариабельную область, но в качестве константных областей тяжелой и легкой цепей использовали константную область тяжелой цепи mIgG1 мыши и константную область каппа-цепи мыши. Поскольку активность моноклональных антител-агонистов CD40 зависит от перекрестного связывания Fc γ RIIb с их Fc, 9E5-mIgG1, в котором используется константная область тяжелой цепи IgG1 мыши, может лучше проявлять активность агониста CD40 у мышей. В эксперименте на эффективности *in-vivo* у мышей 9E5-mIgG1 было лучшим контрольным антителом, чем 9E5-SELFNS.

Ab10-A297V3-4 обладает более сильной противоопухолевой активностью, чем mAb CD40 9E5-mIgG1 при той же молярной дозе, с точки зрения TGI (ингибирование роста опухоли) или CR (полный ответ). Последовательности 9E5-mIgG1 являются следующими:

> Тяжелая цепь 9E5-mIgG1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYILTTYWITWVRQAPGQGLEWMGDIHP
 GSGSTKYNEKFKSRVTLTVDTISISTAYMELSRLRSEDVAVYYCARRDYWGQGTITVTVSS
 AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS
 DLYTLSSSVTVPSSTWVPSSTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP
 PKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVS
 ELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVS
 LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNT
 FTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPGK

(SEQ ID NO: 64)

> Легкая цепь 9E5-mIgG1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV
 TNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLVPWTFGGGKVEIKRAD
 AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK
 DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO: 65)

Противоопухолевая активность Ab10-A297V3-2 в двукратной молярной концентрации все еще слабее, чем у Ab10-A297V3-4, но аналогична таковой у 9E5-mIgG1.

Активацию периферического CD40 молекулами биспецифических антител измеряли путем измерения активации В-лимфоцитов периферической крови мыши. Результаты согласуются с экспериментом *in vitro*. Ab10-A297V3-4 был способен частично активировать периферические В-лимфоциты благодаря своей активности активации CD40, частично независимой от FAP, в то время как Ab10-A297V3-2 не вызывал обнаружимо значимой активации периферических В-клеток (односторонний ANOVA), поскольку его активация CD40 полностью зависит от FAP. Информация об исследуемых антителах показана в таблице 22. Результаты эффективности *in-vivo* показаны на фиг. 13A ($P < 0,0001$ для всех групп антител по сравнению с контрольной группой hIgG1) и фиг. 13B.

Таблица 22. Информация об исследуемых антителах

Лекарственное средство	Концентрация	Молекулярная масса (кДа)	Доза
hIgG1	14,17 мг/мл	150	3 мг/кг
Ab10-A297V3-2	2,95 мг/мл	174	6,96 мг/кг
Ab10-A297V3-4	3 мг/мл	200,03	4 мг/кг
9E5-mIgG1	4,4 мг/мл	150	3 мг/кг

Что касается токсичности для мышей, ни Ab10-A297V3-2, ни Ab10-A297V3-4 не вызывали изменений массы тела мышей. См. фиг. 13C.

Результаты общего анализа крови показывают, что по сравнению с контрольной группой hIgG1 при той же молярной дозе 9E5-mIgG1 вызывал определенное снижение количества тромбоцитов, аналогичное гепатотоксичности; Ab10-A297V3-2 не вызывал снижения количества тромбоцитов; Ab10-A297V3-4 вызывал такое же снижение количества тромбоцитов, как и 9E5-mIgG1. См. фиг. 13D. Доза Ab10-A297V3-2/4, вводимая мышам, и статистические данные о степени ингибирования роста опухоли подробно описаны в таблице 23.

Формула для расчета TGI:

$$TGI = (\text{суточный объем опухоли в холостой группе} - \text{суточный объем опухоли в группе введения}) / (\text{суточный объем опухоли в холостой группе}) \times 100\%$$

Таблица 23. Доза Ab10-A297V3-2 или 4, вводимая мышам, и степени ингибирования роста опухоли

№ антитела	Доза (мг/кг)	TGI
hIgG1	3	-
Ab10-A297V3-2	6,96 (двукратная молярная доза)	54,6%
Ab10-A297V3-4	4 (эквимольная доза)	96,4%
9E5-mIgG1	3	59,2%

Как видно из результатов ALT и AST, 9E5-mIgG1 продемонстрировал некоторую гепатотоксичность на 8-й день после введения дозы посредством CD32B (т.е. FcγRIIB)-опосредованного перекрестного сшивания. Ab10-A297V3-4 обладает некоторой гепатотоксичностью из-за определенного уровня фоновой активации, но поскольку его активация не зависит от CD32B, гепатотоксичность ниже, чем у 9E5-mIgG1. Ab10-A297V3-2 вообще не обладает гепатотоксичностью, поскольку его активация CD40 зависит от FAP. См. фиг. 13E.

4.2. Эффективность и токсичность многократной дозы in-vivo Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 у мышей

Для изучения терапевтического окна Ab10-A297V3-2 или 4 доза Ab10-A297V3-2 была дополнительно увеличена, а доза молекулы Ab10-A297V3-4 была уменьшена. См.

Таблицу 24 для получения подробной информации. Когда доза двухвалентной молекулы Ab10-A297V3-2 была дополнительно увеличена, ее противоопухолевая активность не была дополнительно улучшена, и активация периферических В-лимфоцитов также не наблюдалась. Когда доза Ab10-A297V3-4 была снижена до 1,3 мг/кг (т.е. 1/3 молярной дозы 9E5-mIgG1), она все еще имела TGI 92,6%, что было намного лучше, чем у 9E5-mIgG1.

Чтобы оценить роль антитела FAP в четырехвалентном биспецифическом антителе CD40 в экспериментах *in vivo*, противоопухолевую активность Ab10-A297V3-4 сравнивали с активностью другого четырехвалентного биспецифического антитела CD40 без функции связывания FAP (изотип-A297V3-4). Изотип A297V3-4 идентичен Ab10-A297V3-4 в структурном отношении, за исключением того, что он содержит другое изотипическое антитело, которое не связывается с какими-либо мышечными белками вместо фрагмента Ab10 антитела к FAP.

Результаты на фиг. 14A-14E показывают, что четырехвалентное биспецифическое антитело к CD40 может проявлять относительно хорошую противоопухолевую активность даже без связывания с FAP; кроме того, его противоопухолевая активность может быть сильнее, если оно связывается с FAP. Что касается токсичности, то повышенная доза Ab10-A297V3-2 по-прежнему не вызывала аномальной массы тела, уровней ALT/AST или количества тромбоцитов, а сниженная доза Ab10-A297V3-4 не вызывала аномальных уровней ALT/AST или количества тромбоцитов, которые наблюдались при более высокой дозе ранее, при этом сохраняя очень сильный противоопухолевый эффект ($P < 0,0001$). Это указывает на то, что как Ab10-A297V3-2, так и Ab10-A297V3-4 имеют более широкие терапевтические окна, чем mAb CD40 9E5-mIgG1. Информация об антителах показана в таблице 24. Статистические данные об эффективности многократных доз *in-vivo* Ab10-A297V3-2 или Ab10-A297V3-4 приведены в Таблице 25.

Таблица 24. Информация об исследуемых антителах

Лекарственное средство	Концентрация	Молекулярная масса (кДа)	Доза
hIgG1	14,17 мг/мл	150	3 мг/кг
Ab10-A297V3-2	2 мг/мл	174	6,96 мг/кг
Ab10-A297V3-2			13,92 мг/кг
Ab10-A297V3-4	2 мг/мл	200,03	4 мг/кг
Ab10-A297V3-4			1,3 мг/кг
Изотип-A297V3-4	3,44 мг/мл	200,03	1,3 мг/кг

9E5-mIgG1	4,79 мг/мл	150	3 мг/кг
-----------	------------	-----	---------

Таблица 25. Статистические данные об эффективности многократных доз in-vivo Ab10-A297V3-2/4

Лекарственное средство	Доза (мг/кг)	TGI	Соотношение CR (<100 мм ³)
hIgG1	3	-	0%
Ab10-A297V3-2	6,96 (двукратная молярная доза)	32,8%	0%
Ab10-A297V3-2	13,92 (четырёхкратная молярная доза)	46,9%	0%
Ab10-A297V3-4	4 (эквимолярная доза)	101,6%	100%
Ab10-A297V3-4	1,3 (1/3 молярной дозы)	92,6%	33%
Изотип-A297V3-4	1,3 (1/3 молярной дозы)	79,3%	0%
9E5-mIgG1	3	59,2%	0%

4.3. Эффективность и токсичность многократных доз in-vivo Ab10-A12V2-2 у мышей
См. фиг. 15A-15D и таблицу 26. Ab10-A12V2-2 имеет аналогичные фармакологические характеристики с Ab10-A297V3-2 у мышей ($P < 0,0001$ для обеих доз по сравнению с контрольной группой hIgG1) и превосходит по противоопухолевой активности 9E5-mIgG1. Противоопухолевая активность не может быть дополнительно улучшена за счет увеличения дозы, но увеличение ALT/AST или снижение количества тромбоцитов не было вызвано. Это предполагает более широкое терапевтическое окно и снижение побочных эффектов.

Таблица 26. Информация об исследуемых антителах и TGI

Лекарственное	Концентрация	Молекулярная	Доза	TGI
---------------	--------------	--------------	------	-----

средство		масса (кДа)		
hIgG1	14,17 мг/мл	150	3 мг/кг	-
Ab10-A12V2-2	2 мг/мл	174	6,96 мг/кг	81,8%
Ab10-A12V2-2			13,92 мг/кг	70,9%
9E5-mIgG1	4,79 мг/мл	150	3 мг/кг	59,2%

4.4. Эффективность и токсичность однократной дозы in-vivo Ab10-A12V2-4 у мышей

Аналогичным образом, в этом примере исследуется эффективность и токсичность однократной дозы Ab10-A12V2-4 у мышей. По сравнению с контрольной группой hIgG1 группа Ab10-A12V2-4 ($P < 0,0001$) превосходит по противоопухолевой активности 9E5-mIgG1 и не вызывала повышения уровня ALT/AST или снижения уровня тромбоцитов. См. таблицу 27 и фиг. 16A-16D.

Таблица 27. Информация об исследуемых антителах и TGI

Лекарственное средство	Концентрация	Молекулярная масса (кДа)	Доза	TGI
hIgG1	14,17 мг/мл	150	3 мг/кг	-
Ab10-A12V2-4	3 мг/мл	200,03	4 мг/кг	88,3%
9E5-mIgG1	4,4 мг/мл	150	3 мг/кг	59,2%

4.5. Измерение фармакокинетики биспецифических антител к FAP/CD40

В настоящем изобретении сравниваются фармакокинетические характеристики биспецифических антител к FAP/CD40 у гуманизированных мышей с hCD40, несущих опухоль mFAP-МС38, с трех разных точек зрения. Антитела вводили путем внутривенной инъекции в разных концентрациях, а затем отбирали образцы крови в разные моменты времени. Кривую концентрация в плазме/время каждой из молекул антитела анализировали путем измерения содержания Fc человека в крови мыши.

Антитело к IgG-Fc человека разбавляли до 1,5 мкг/мл с помощью PBS и использовали для покрытия планшета при 100 мкл/лунку, и планшет оставляли на ночь при 4 °C. Раствор удаляли и планшет промывали PBST (PBS + Tween 20) (200 мкл/лунку) три раза. После удаления PBST планшет блокировали 1% BSA (100 мкл/лунку) при 37 °C в течение 2 часов. Раствор удаляли. После того, как планшет трижды промывали PBST (200 мкл/лунку), добавляли разбавленные антитела или образцы сыворотки (все разбавляли 1% BSA PBS; сыворотку разбавляли в 10 раз, 100 раз, 1000 раз и 10000 раз) при 50 мкл/лунку и

планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Раствор удаляли. После того, как планшет трижды промывали PBST (200 мкл/лунку), добавляли меченное HRP козье вторичное антитело к IgG-Fc человека (разбавленное 1% BSA PBS, 1:20 000) при 50 мкл/лунку и планшет инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Раствор удаляли. После того, как планшет промывали PBST (200 мкл/лунку) пять раз, добавляли TMB при 50 мкл/лунку для проявления цвета. После того, как наблюдали градиентные цветовые реакции антител, добавляли стоп-раствор ELISA в количестве 50 мкл/лунку. Значения OD450 измеряли на Envision. После того, как показания OD450 в сыворотке, которые находились в линейном диапазоне стандартной кривой антитела, были преобразованы в концентрации, были построены и проанализированы PK (фармакокинетические) кривые.

Результаты показаны на фиг. 17, на которой сравниваются фармакокинетические характеристики молекул Ab10-A297V3-2 и Ab10-A12V2-2 в дозе 13,92 мг/кг. Результаты показывают, что две молекулы имеют сходные фармакокинетические характеристики. Таким образом, фармакокинетические характеристики биспецифических антител по настоящему изобретению не варьируются в зависимости от различных последовательностей антител к CD40.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула, связывающая FAP/CD40, содержащая первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, где первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи; причем переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1 (HCDR - область, определяющая комплементарность, тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3, а переменная область легкой цепи содержит LCDR1 (LCDR - область, определяющая комплементарность, легкой цепи), LCDR2 и LCDR3, где:

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 18, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 19, соответственно;

предпочтительно,

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 16, соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 17, соответственно.

2. Молекула, связывающая FAP/CD40, по п. 1, где второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, содержит по меньшей мере один одиночный переменный домен иммуноглобулина, и одиночный переменный домен иммуноглобулина содержит три области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2

и CDR3, где CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно;

предпочтительно, CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно; или CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно.

3. Молекула, связывающая FAP/CD40, по п. 1 или 2, где в первом антигенсвязывающем домене, специфически связывающемся с FAP:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей; или

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

4. Молекула, связывающая FAP/CD40, по п. 2 или 3, где одиночный вариабельный домен иммуноглобулина во втором антигенсвязывающем домене, специфически связывающемся с CD40, содержит любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38.

5. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 2-4, где второй

антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, содержит 2, 3, 4, 5 или 6 указанных одиночных вариабельных доменов иммуноглобулина.

6. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 2-5, где первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на N-конце вариабельной области тяжелой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP;

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на C-конце вариабельной области тяжелой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP;

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на N-конце вариабельной области легкой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP; и/или

одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, расположен на C-конце вариабельной области легкой цепи первого антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с FAP.

7. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 2-6, где одиночный вариабельный домен иммуноглобулина второго антигенсвязывающего домена, специфически связывающегося с CD40, связан, напрямую или с помощью линкера, с первым антигенсвязывающим доменом, специфически связывающимся с FAP;

предпочтительно линкер представляет собой аминокислотную последовательность, представленную $(G_4S)_x$, где x независимо выбран из целого числа от 1 до 20;

более предпочтительно, линкер представляет собой аминокислотную последовательность, представленную $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$ или $(G_4S)_4$.

8. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащая Fc-область иммуноглобулина человека, где:

предпочтительно, Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 или IgG4 человека;

более предпочтительно, IgG1 человека имеет мутацию, которая удаляет или уменьшает эффекторную функцию Fc;

наиболее предпочтительно, IgG1 человека имеет мутацию, выбранную из группы, состоящей из N297A, D265A/N297A, L234A/L235A, L234A/L235A/P329G, L234E, L234F, L234E/L235F и L234E/L235F/P329G.

9. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 1-8, где первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где:

предпочтительно тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, а легкая цепь относится к изотипу каппа;

более предпочтительно тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей; или

тяжелая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и легкая цепь представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

10. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 1-9, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где:

первая полипептидная цепь содержит любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 42 и 44-48, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

предпочтительно, молекула, связывающая FAP/CD40, содержит две идентичные первые полипептидные цепи и две идентичные вторые полипептидные цепи.

11. Молекула, связывающая FAP, содержащая переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 18, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 19, соответственно;

предпочтительно,

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 14, соответственно;

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 15, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 16, соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно; LCDR1, LCDR2 и LCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 12, 13 и 17, соответственно.

12. Молекула, связывающая FAP, по п. 11, где:

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или аминокислотную последовательность, по меньшей

мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей; или

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

13. Молекула, связывающая FAP, по п. 11 или 12, дополнительно содержащая Fc-область иммуноглобулина человека, где:

предпочтительно, Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 или IgG4 человека;

более предпочтительно, IgG1 человека имеет мутацию, которая удаляет или уменьшает эффекторную функцию Fc;

наиболее предпочтительно, IgG1 человека имеет мутацию, выбранную из группы, состоящей из N297A, D265A/N297A, L234A/L235A, L234A/L235A/P329G, L234E, L234F, L234E/L235F и L234E/L235F/P329G.

14. Молекула, связывающая FAP, по любому из пп. 11-13, содержащая тяжелую цепь и легкую цепь, где:

тяжелая цепь представлена в SEQ ID NO: 51 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей, и легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 52 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей;

тяжелая цепь представлена в SEQ ID NO: 49 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей, и легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 50 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей;

тяжелая цепь представлена в SEQ ID NO: 53 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей, и легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 54 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90%

идентичной ей; или

тяжелая цепь представлена в SEQ ID NO: 55 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей, и легкая цепь представлена в SEQ ID NO: 56 или аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% идентичной ей.

15. Молекула, связывающая FAP, по любому из пп. 11-14, представляющая собой антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент, где:

предпочтительно, антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из би- или мультиспецифических антител, scFv, димеров scFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', фрагментов Fv, Fab, Fab' и F(ab')₂;

предпочтительно, антитело к FAP или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.

16. Молекула, связывающая CD40, содержащая одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с CD40, где одиночный вариабельный домен иммуноглобулина содержит три области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, и CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно;

предпочтительно, CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно; или CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно.

17. Молекула, связывающая CD40, по п. 16, содержащая любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

18. Молекула, связывающая CD40, по п. 16 или 17, дополнительно содержащая Fc-область иммуноглобулина человека, где:

предпочтительно, Fc-область представляет собой Fc-область IgG1 или IgG4 человека;

более предпочтительно, Fc-область IgG1 человека имеет мутацию, которая увеличивает аффинность к FcγRIIb и/или уменьшает эффекты ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность);

наиболее предпочтительно, Fc-область IgG1 человека имеет мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E/L328F, L234A/L235A, N297A, L234F, L235E, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S и

E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R.

19. Молекула, связывающая CD40, по любому из пп. 16-18, содержащая любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 57-63, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную ей.

20. Молекула, связывающая CD40, по любому из пп. 16-19, представляющая собой антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент, где:

предпочтительно, антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из линейных антител, одноцепочечных антител, нанотел, пептидных антител, доменных антител и мультиспецифических антител;

предпочтительно, антитело к CD40 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело верблюда, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.

21. Молекула, связывающая FAP/CD40, содержащая первый антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с FAP, и второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, где второй антигенсвязывающий домен, специфически связывающийся с CD40, содержит по меньшей мере один одиночный варибельный домен иммуноглобулина, и одиночный варибельный домен иммуноглобулина содержит три области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, где CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 39, 40 и 41, соответственно;

предпочтительно, CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно; или CDR1, CDR2 и CDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно.

22. Молекула, связывающая FAP/CD40, по п. 21, где одиночный варибельный домен иммуноглобулина во втором антигенсвязывающем домене, специфически связывающемся с CD40, содержит любую из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 32-38.

23. Молекула, связывающая FAP/CD40, по любому из пп. 1-10 и 21-22, представляющая собой биспецифическое антитело к FAP/CD40.

24. Полинуклеотид, кодирующий молекулу, связывающую FAP/CD40, по любому из пп. 1-10 и 21-23, молекулу, связывающую FAP, по любому из пп. 11-15 или молекулу, связывающую CD40, по любому из пп. 16-20.

25. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 24.

26. Клетка-хозяин, содержащая или экспрессирующая полинуклеотид по п. 24 или вектор по п. 25.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу, связывающую FAP/CD40, по любому из пп. 1-10 и 21-23, молекулу, связывающую FAP, по любому из пп. 11-15 или молекулу, связывающую CD40, по любому из пп. 16-20 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

28. Применение молекулы, связывающей FAP/CD40, по любому из пп. 1-10 и 21-23, молекулы, связывающей FAP, по любому из пп. 11-15, молекулы, связывающей CD40, по любому из пп. 16-20, полинуклеотида по п. 24 или фармацевтической композиции по п. 27 при получении лекарственного средства для лечения или облегчения заболевания или состояния, где:

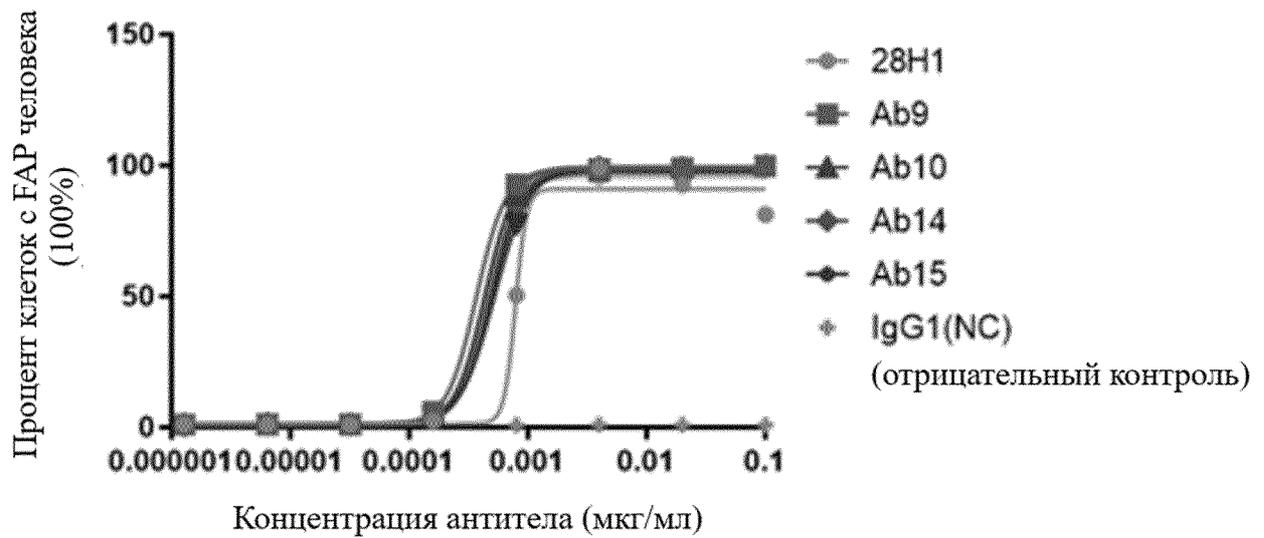
заболевание или состояние предпочтительно представляет собой опухоль или рак;

заболевание или состояние более предпочтительно представляет собой рак легкого, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак матки, рак яичников, рак печени, меланому, рак почки, плоскоклеточный рак или гематологический рак.

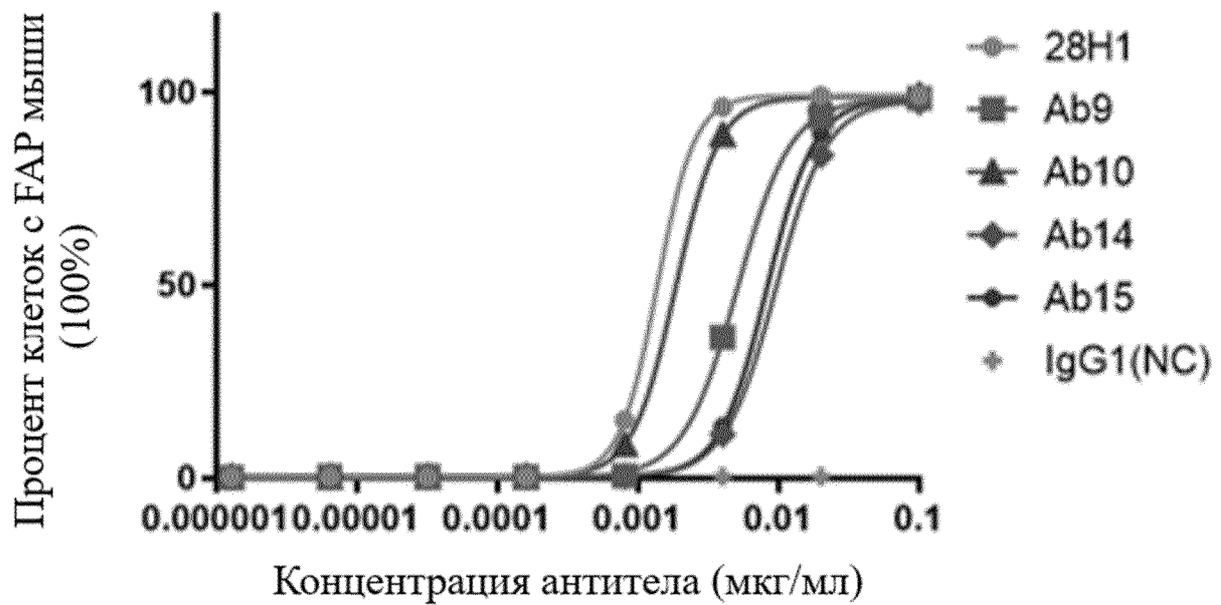
29. Способ лечения или облегчения опухоли или рака, где способ включает:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества молекулы, связывающей FAP/CD40, по любому из пп. 1-10 и 21-23, молекулы, связывающей FAP, по любому из пп. 11-15, молекулы, связывающей CD40, по любому из пп. 16-20, полинуклеотида по п. 24 или фармацевтической композиции по п. 27;

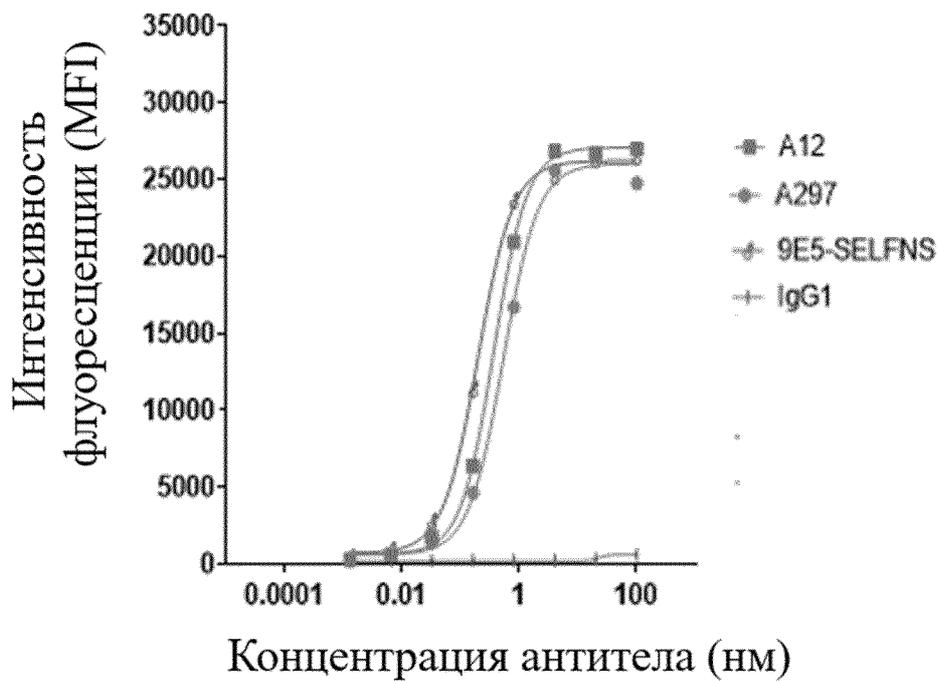
причем опухоль или рак предпочтительно представляет собой рак легкого, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак пищевода, рак желудка, колоректальный рак, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак матки, рак яичников, рак печени, меланому, рак почки, плоскоклеточный рак или гематологический рак.



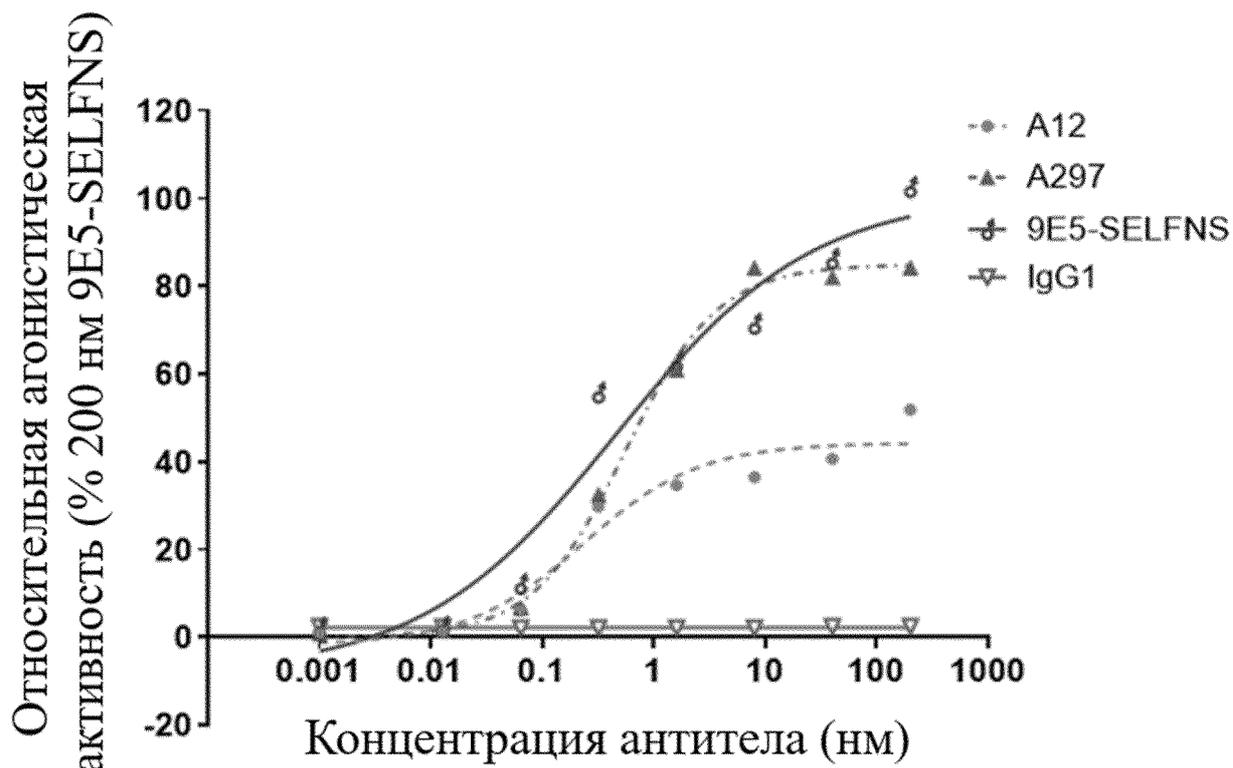
Фиг. 1



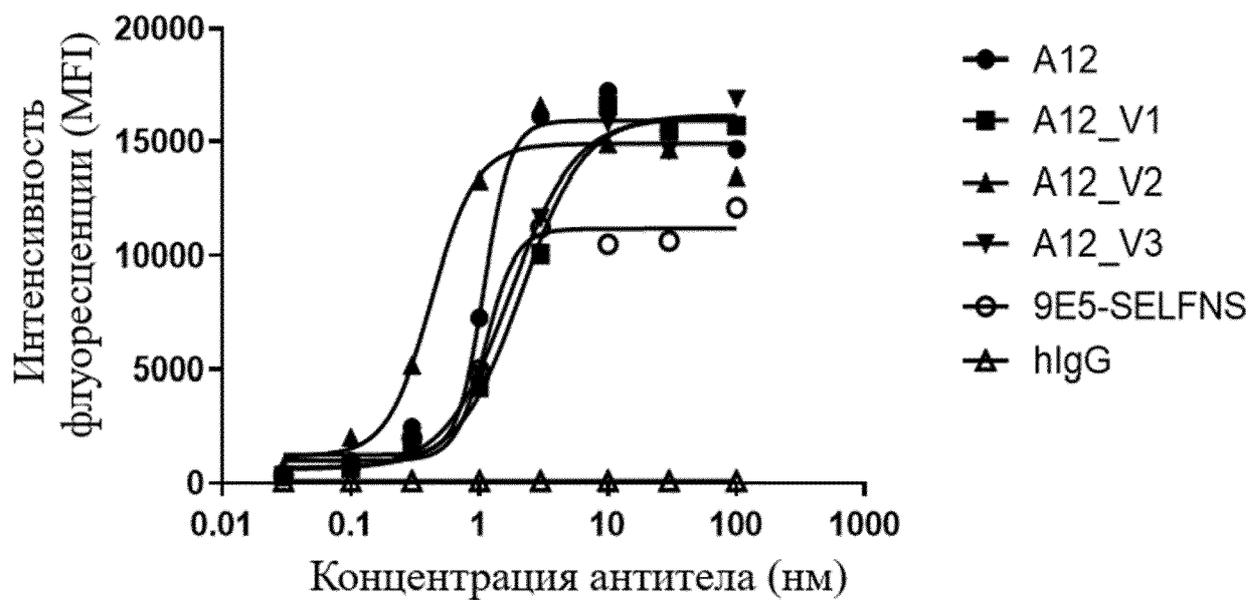
Фиг. 2



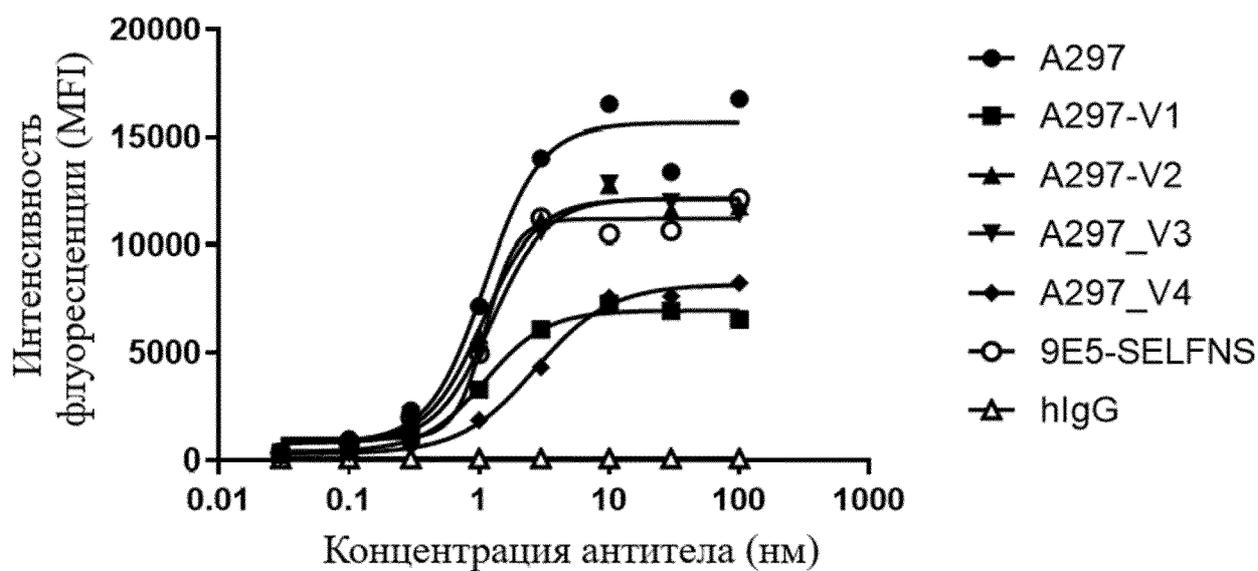
Фиг. 3



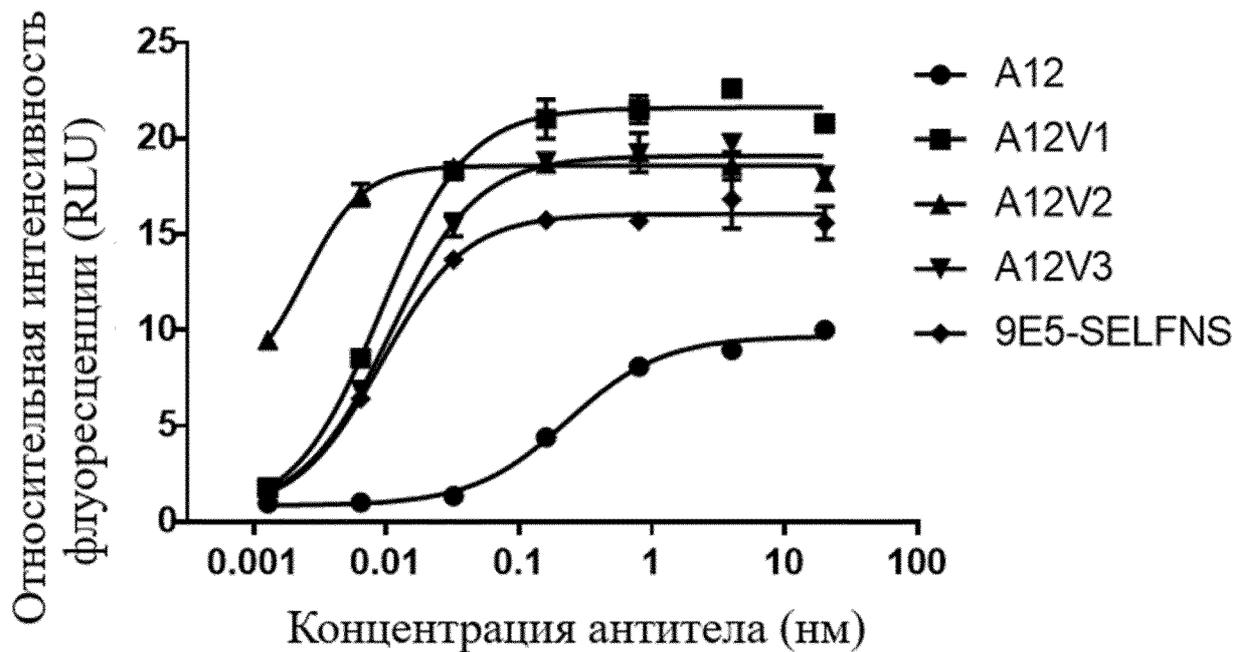
Фиг. 4



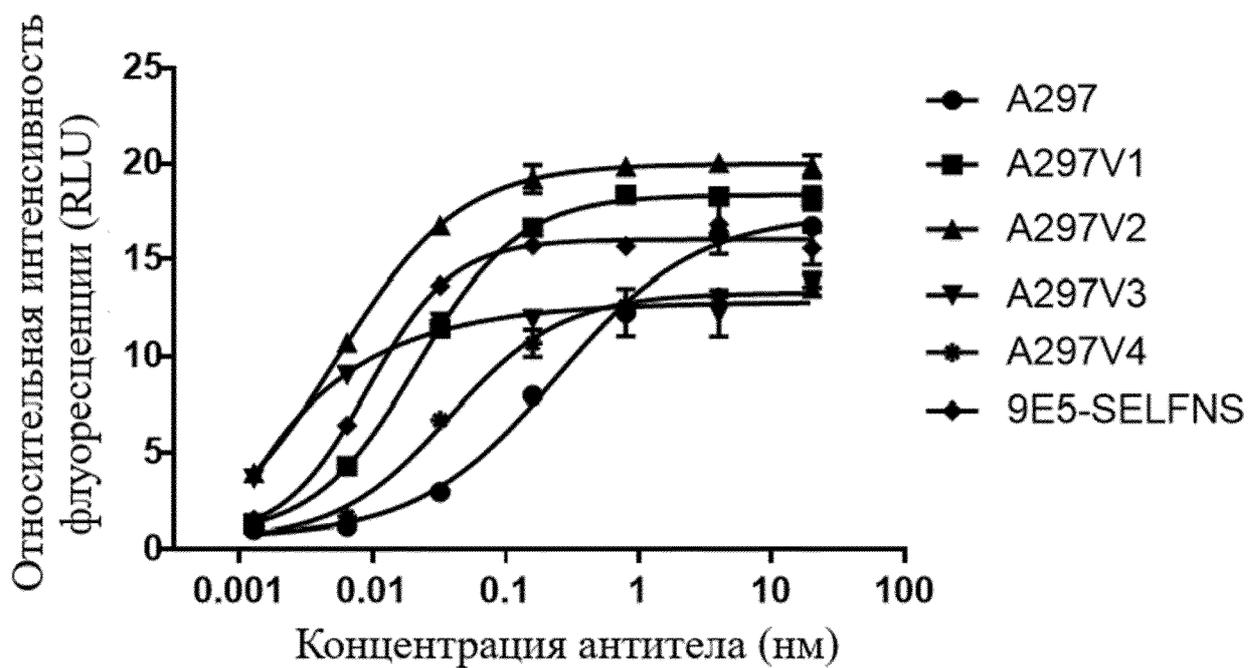
Фиг. 5А



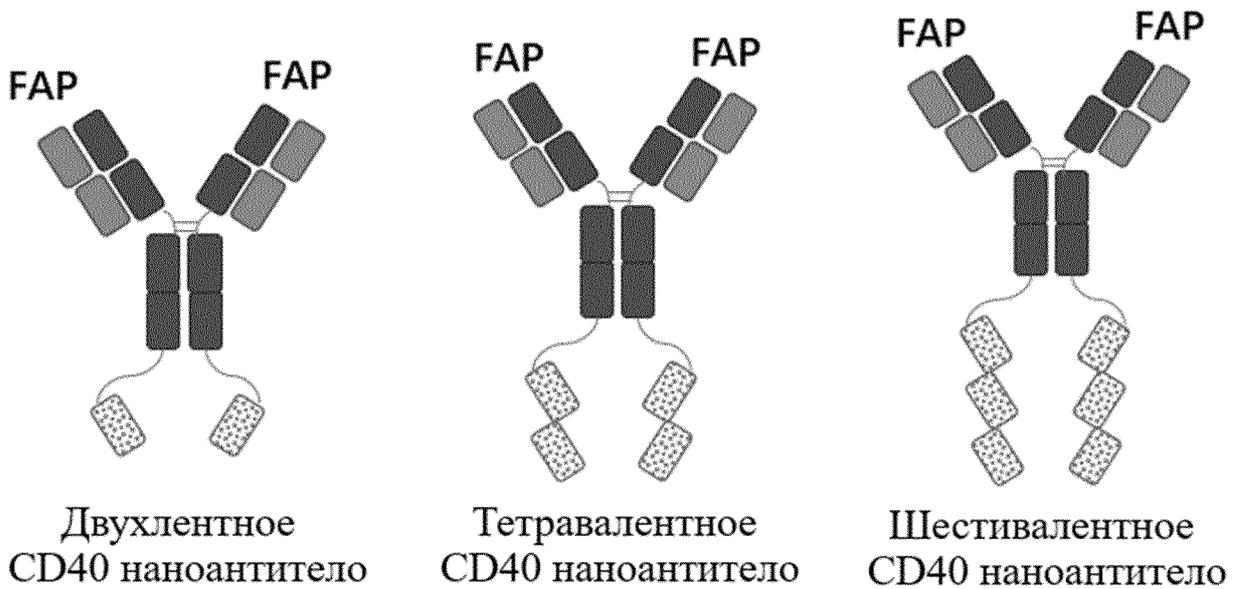
Фиг. 5В



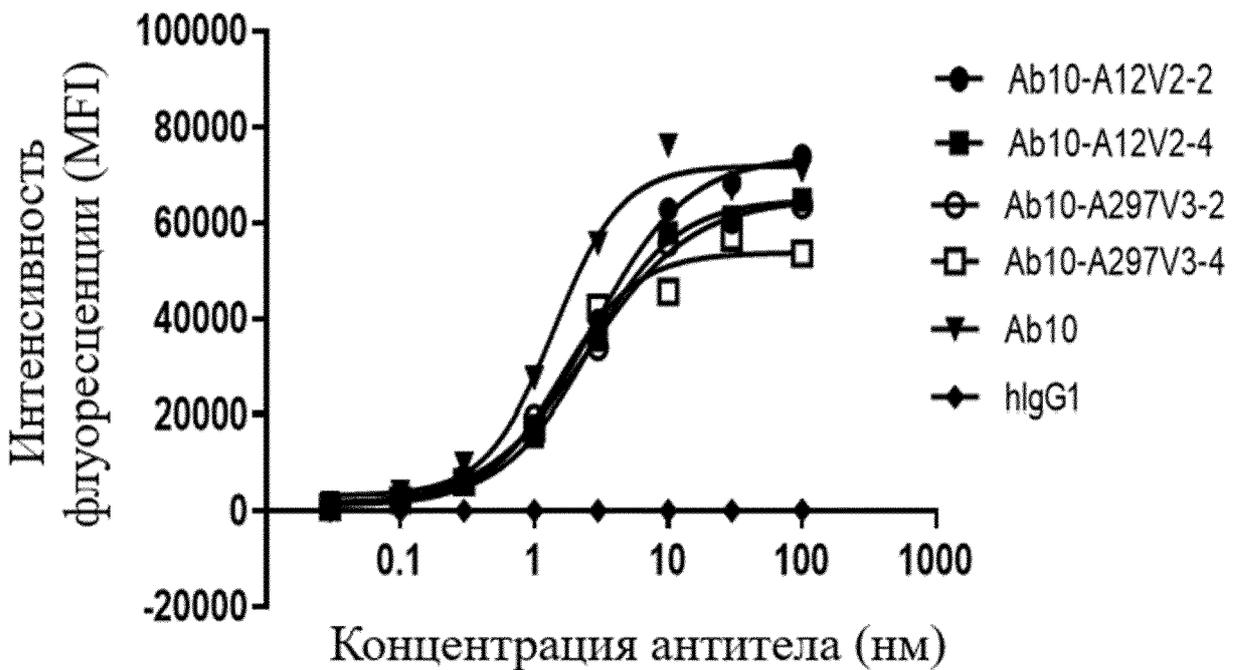
Фиг. 6А



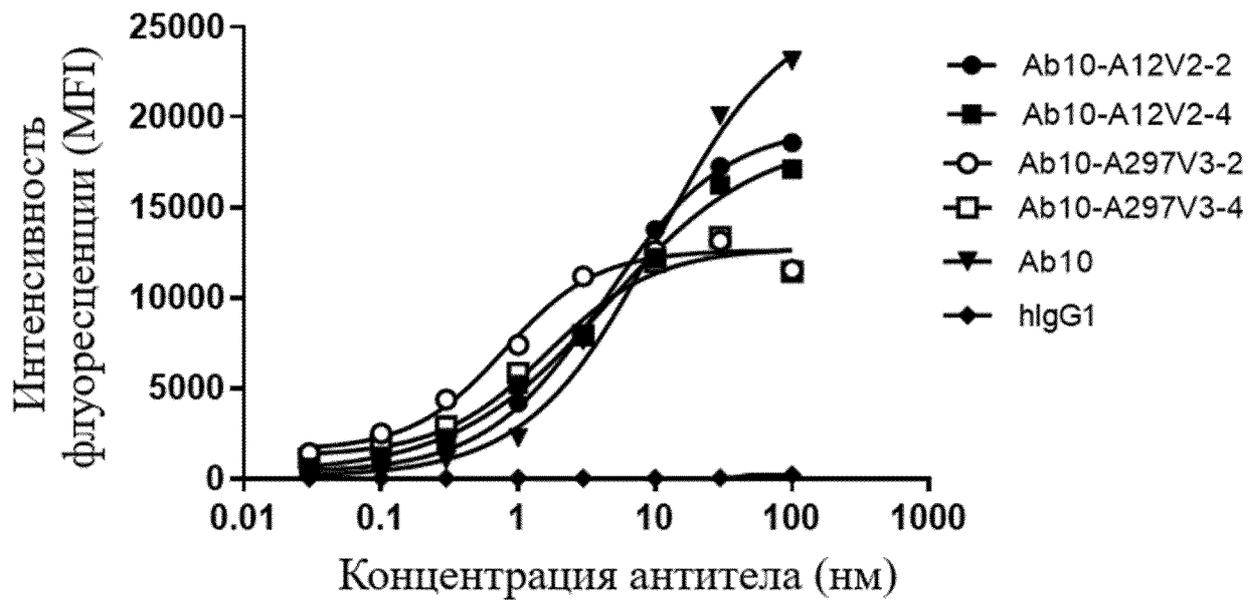
Фиг. 6В



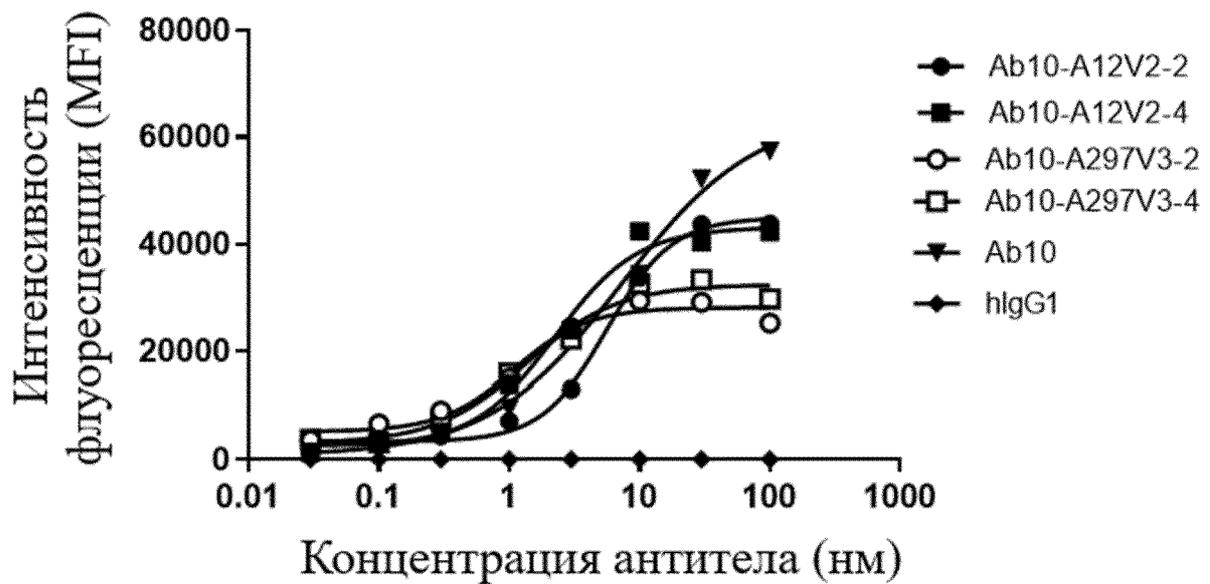
Фиг. 7



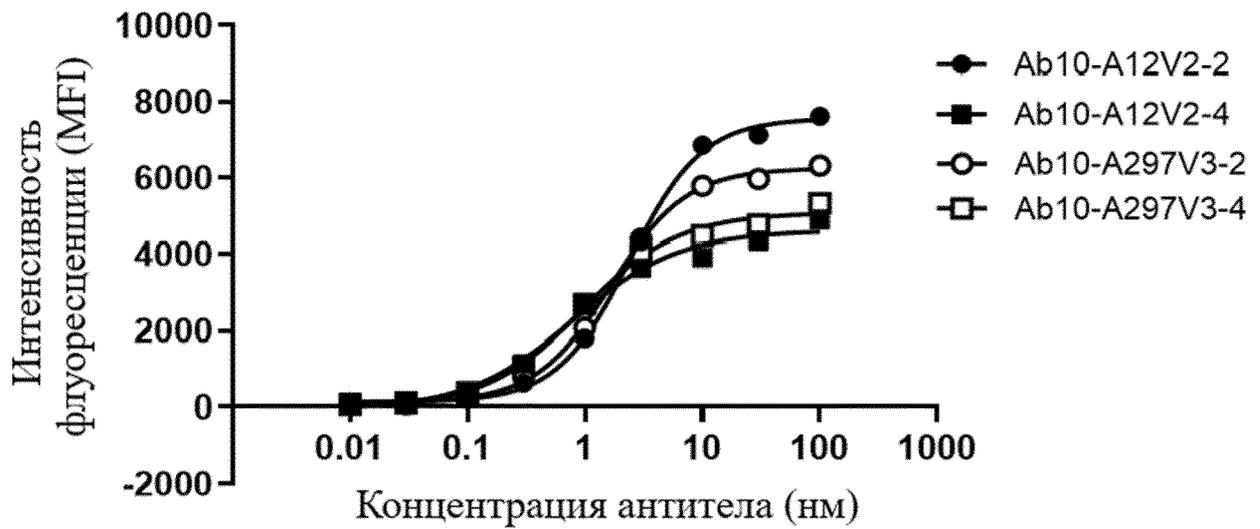
Фиг. 8А



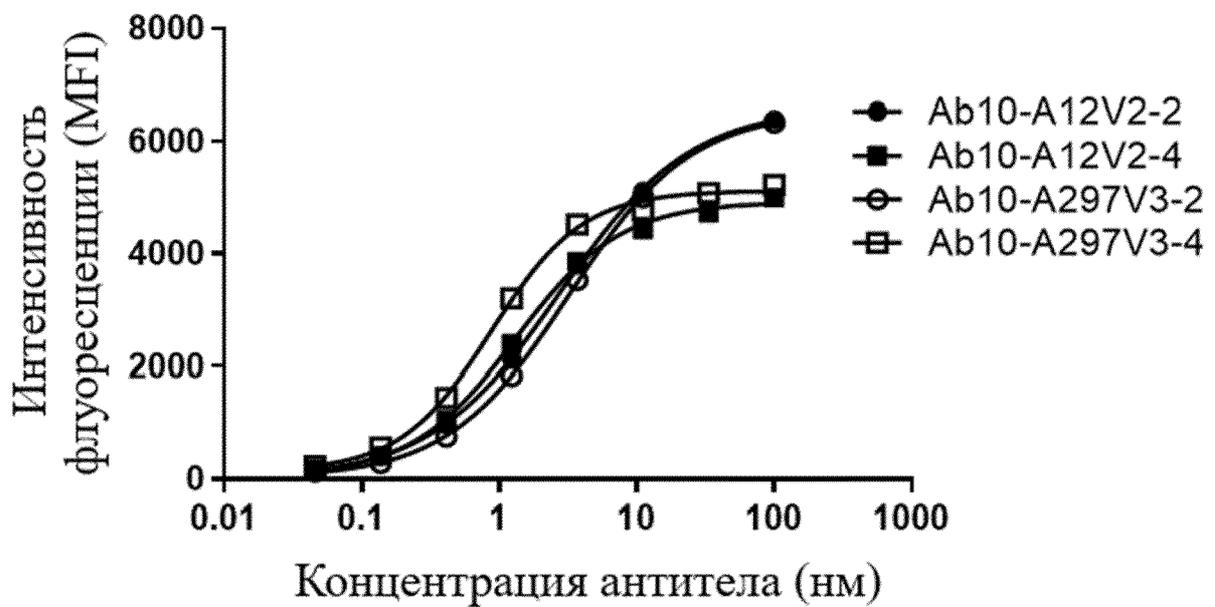
Фиг. 8B



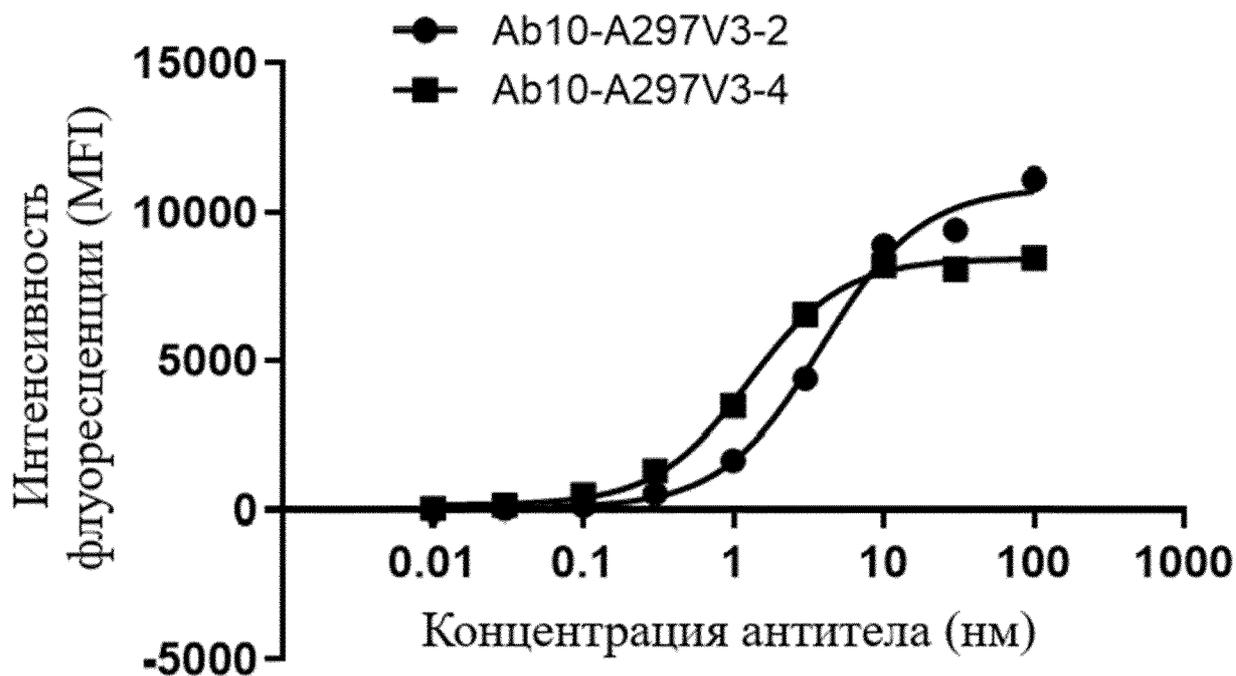
Фиг. 8C



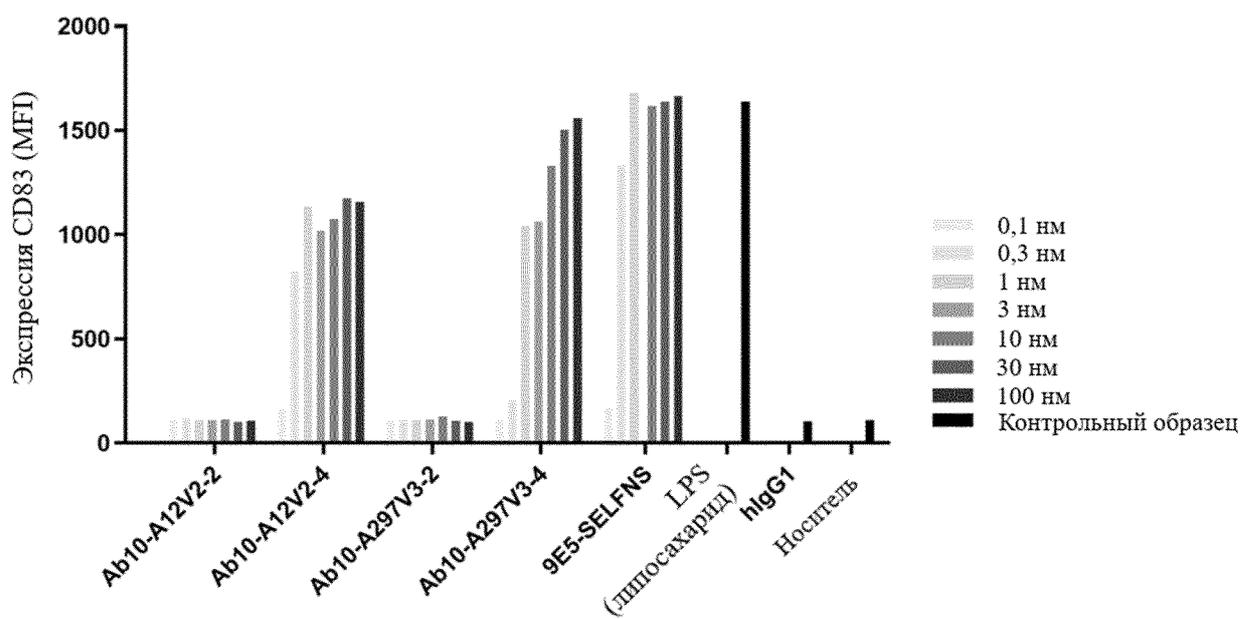
Фиг.9А



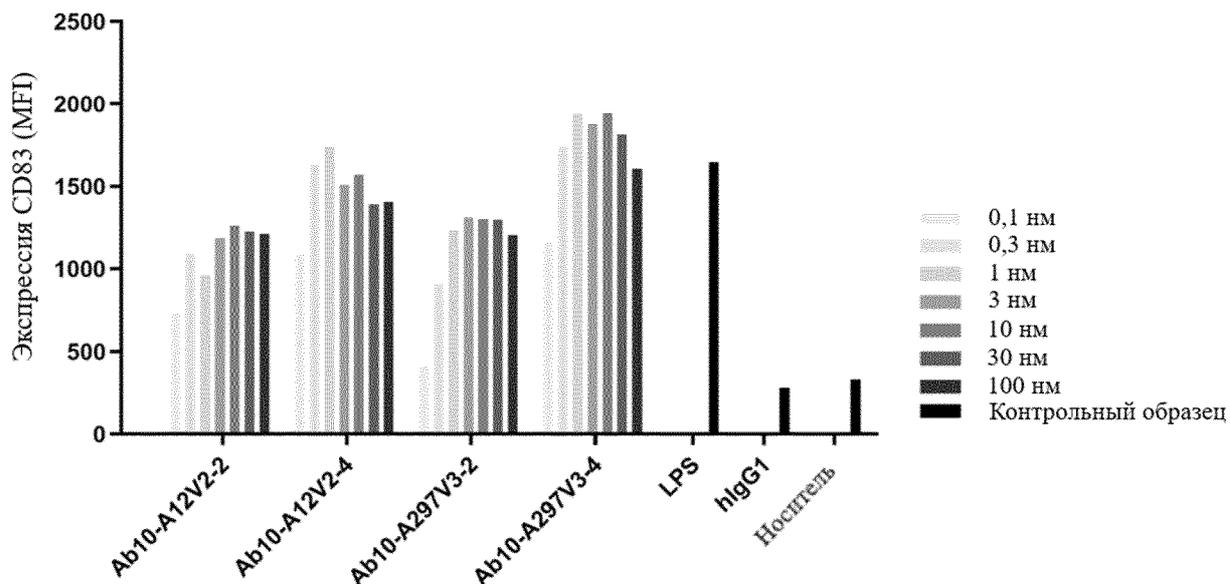
Фиг. 9В



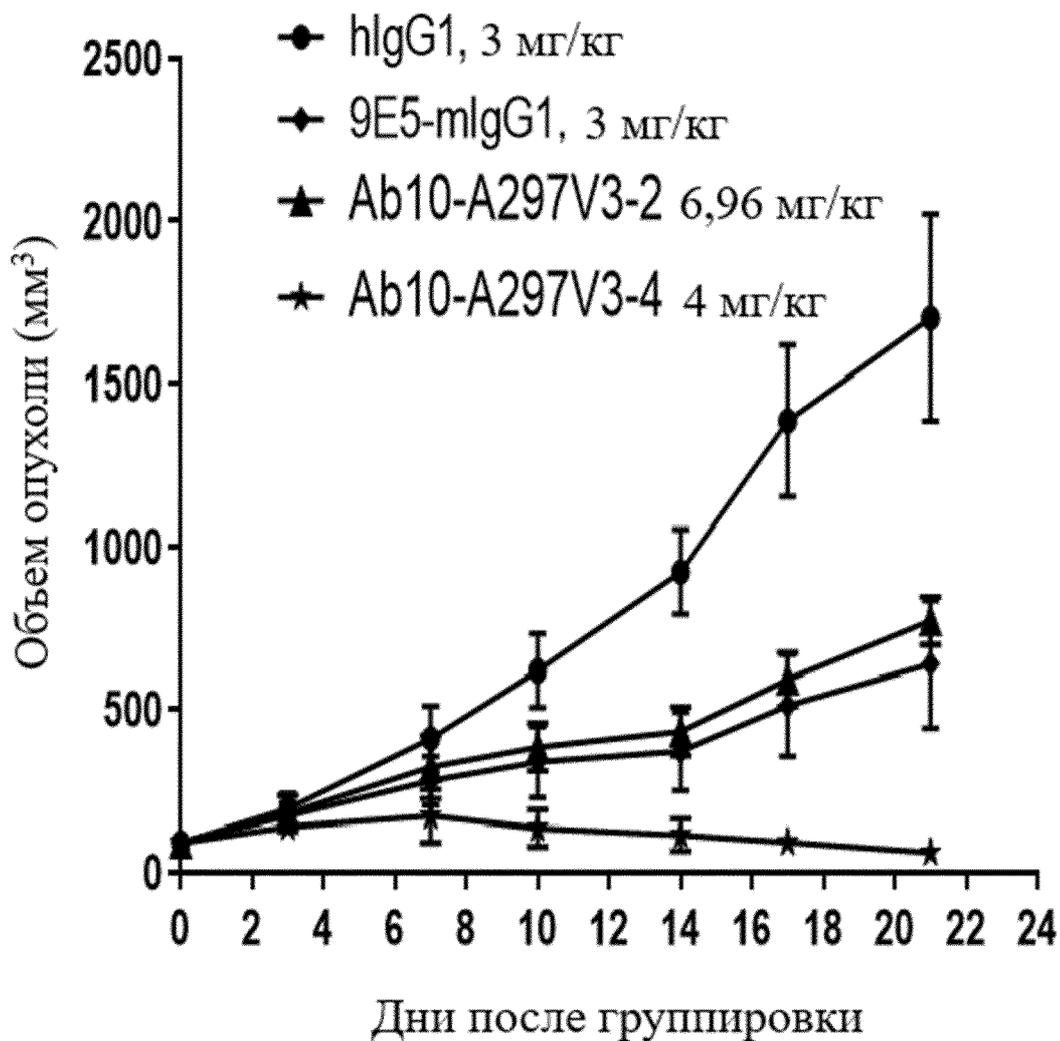
Фиг. 10



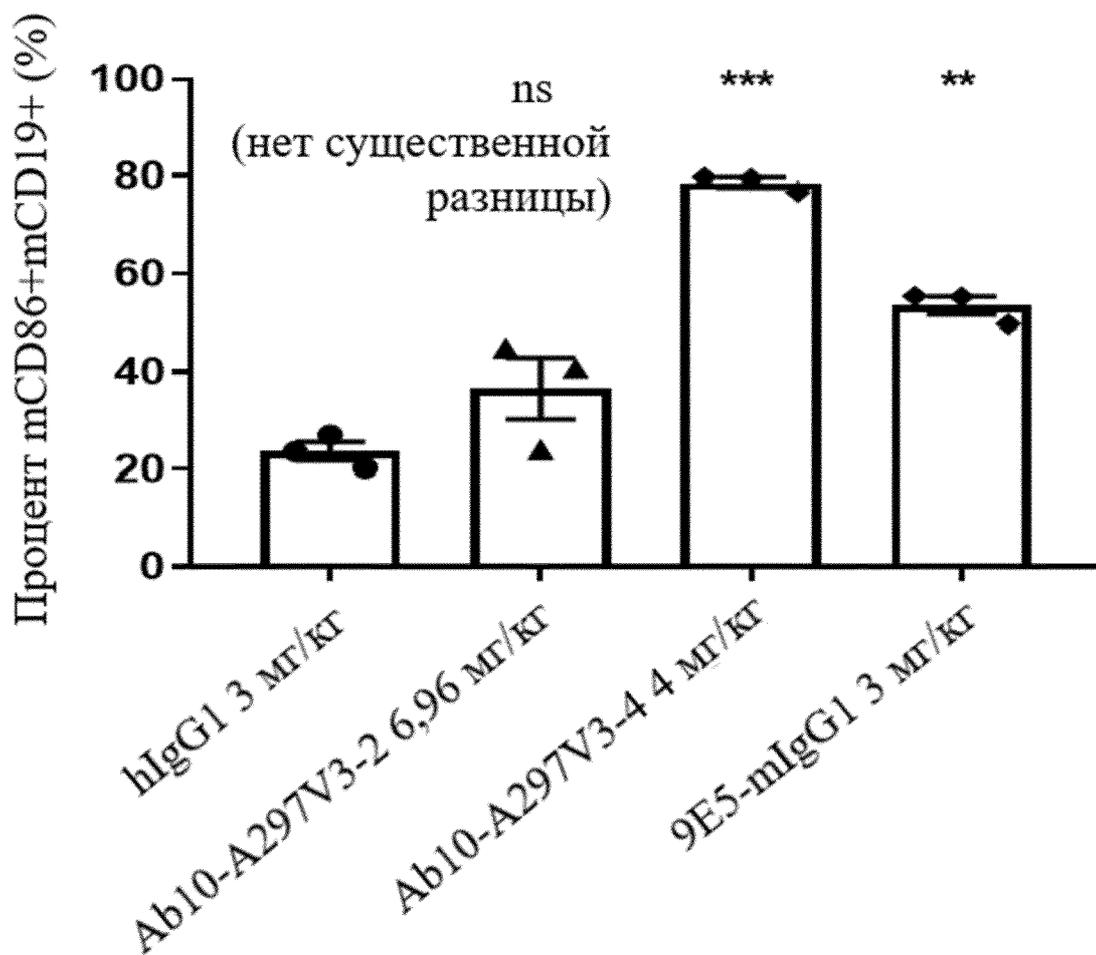
Фиг. 11



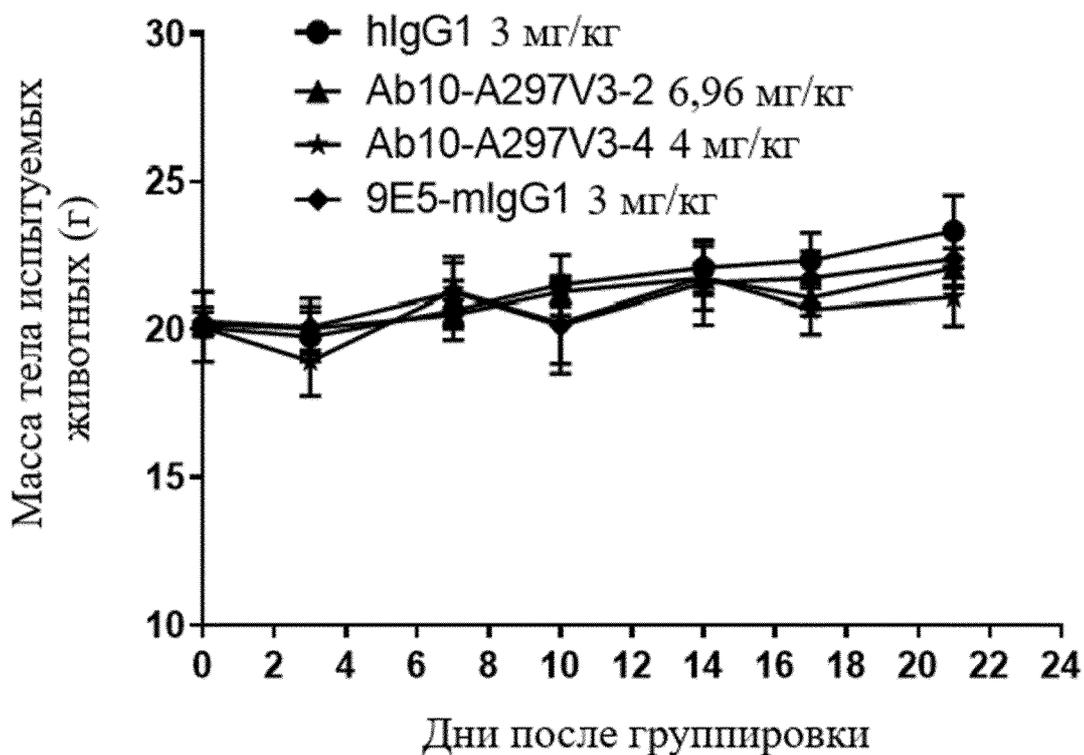
Фиг. 12



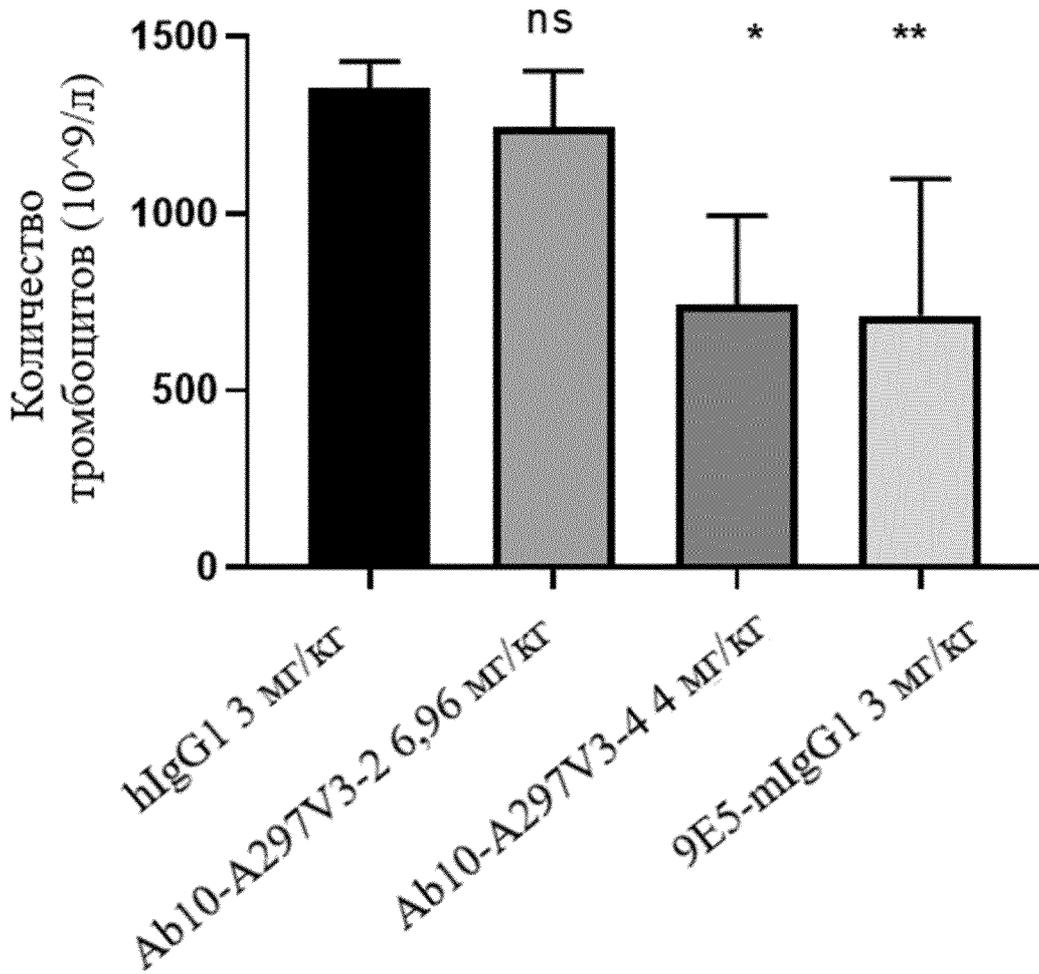
Фиг. 13А



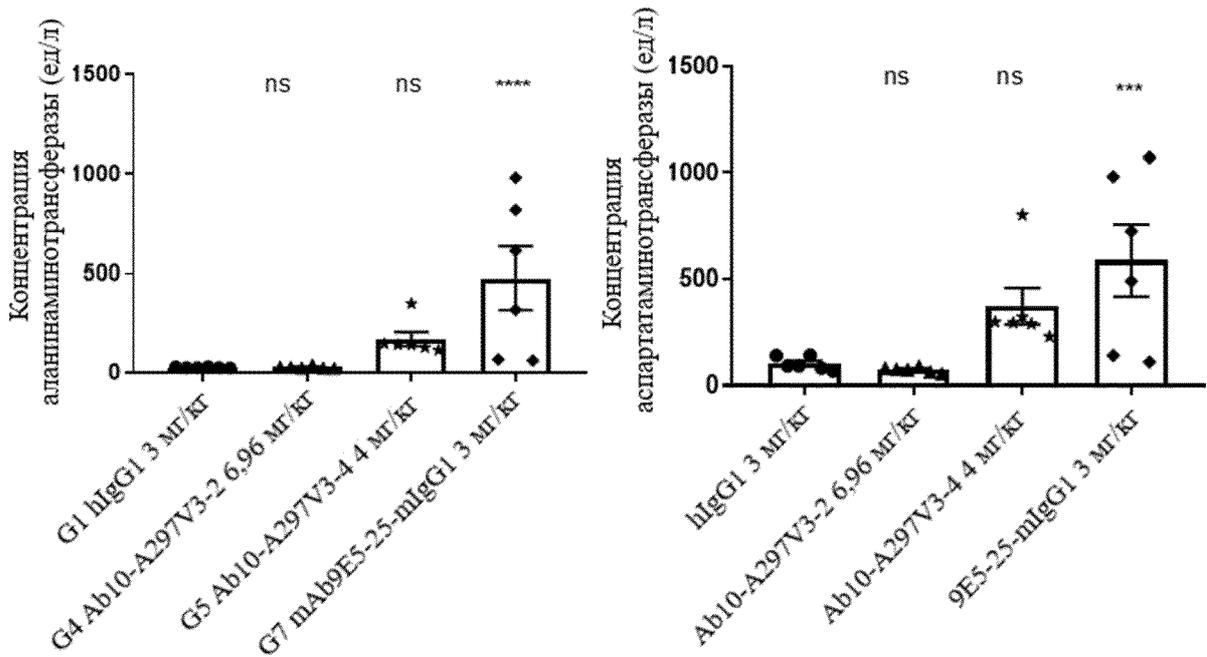
Фиг. 13В



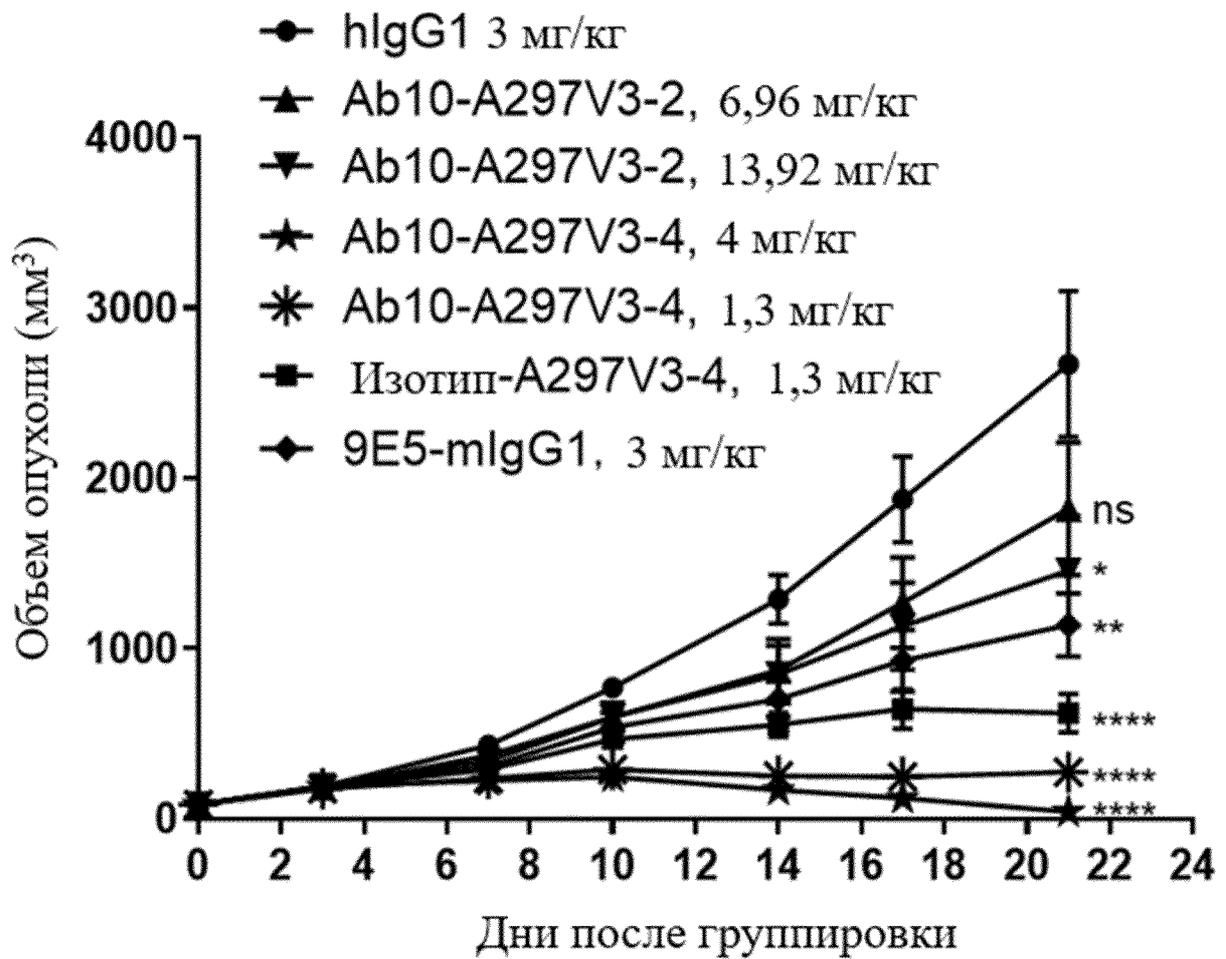
Фиг. 13С



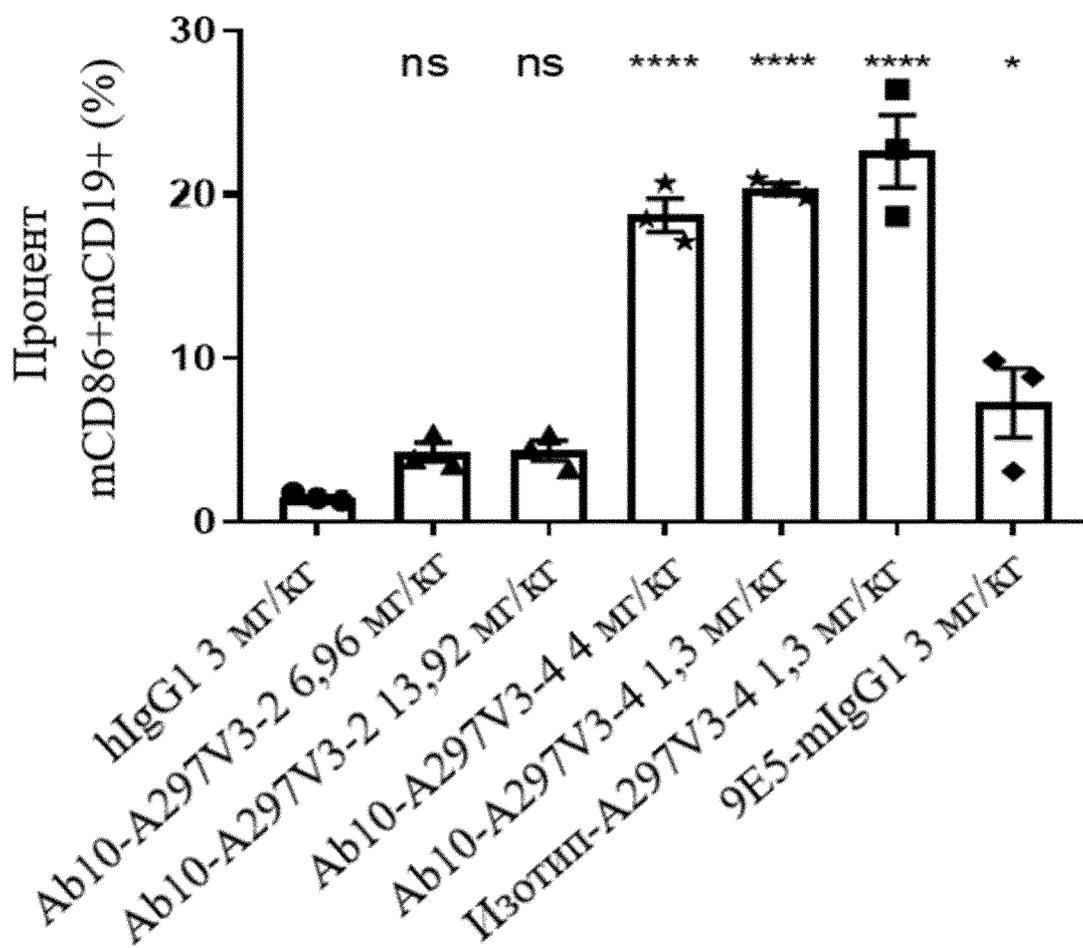
Фиг. 13D



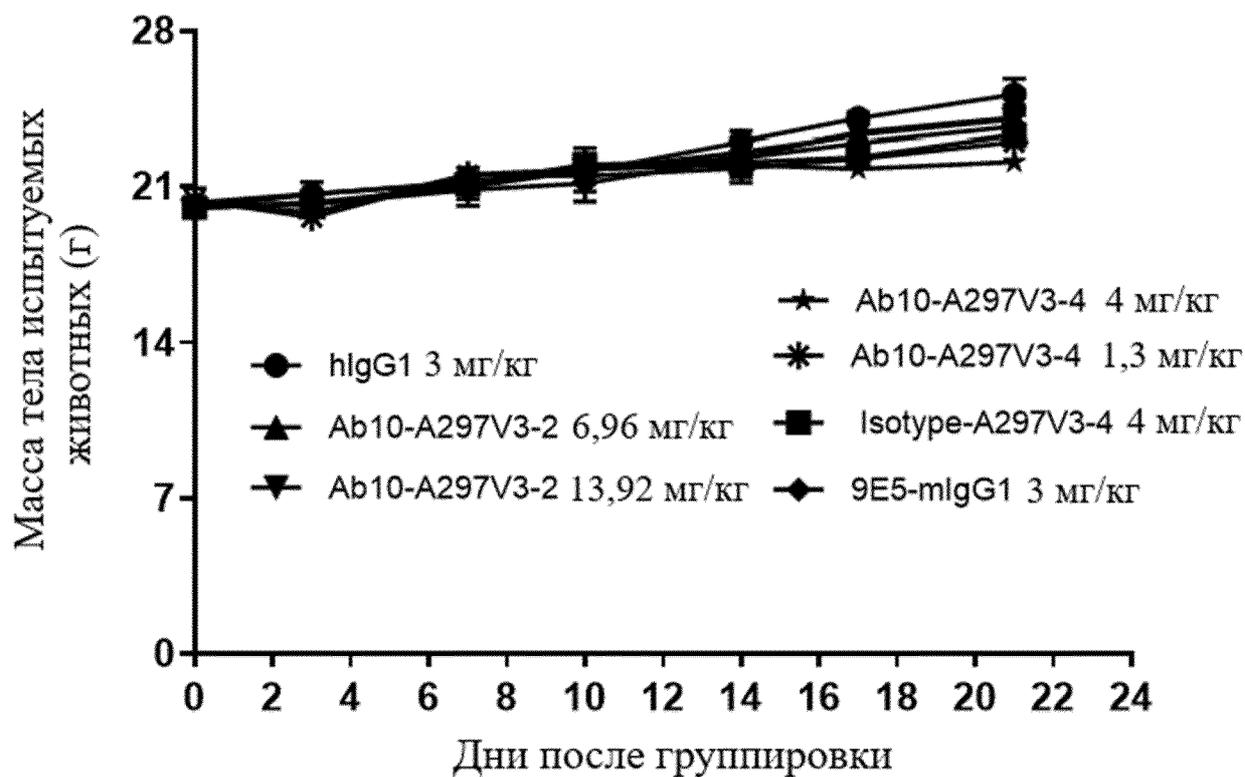
Фиг. 13E



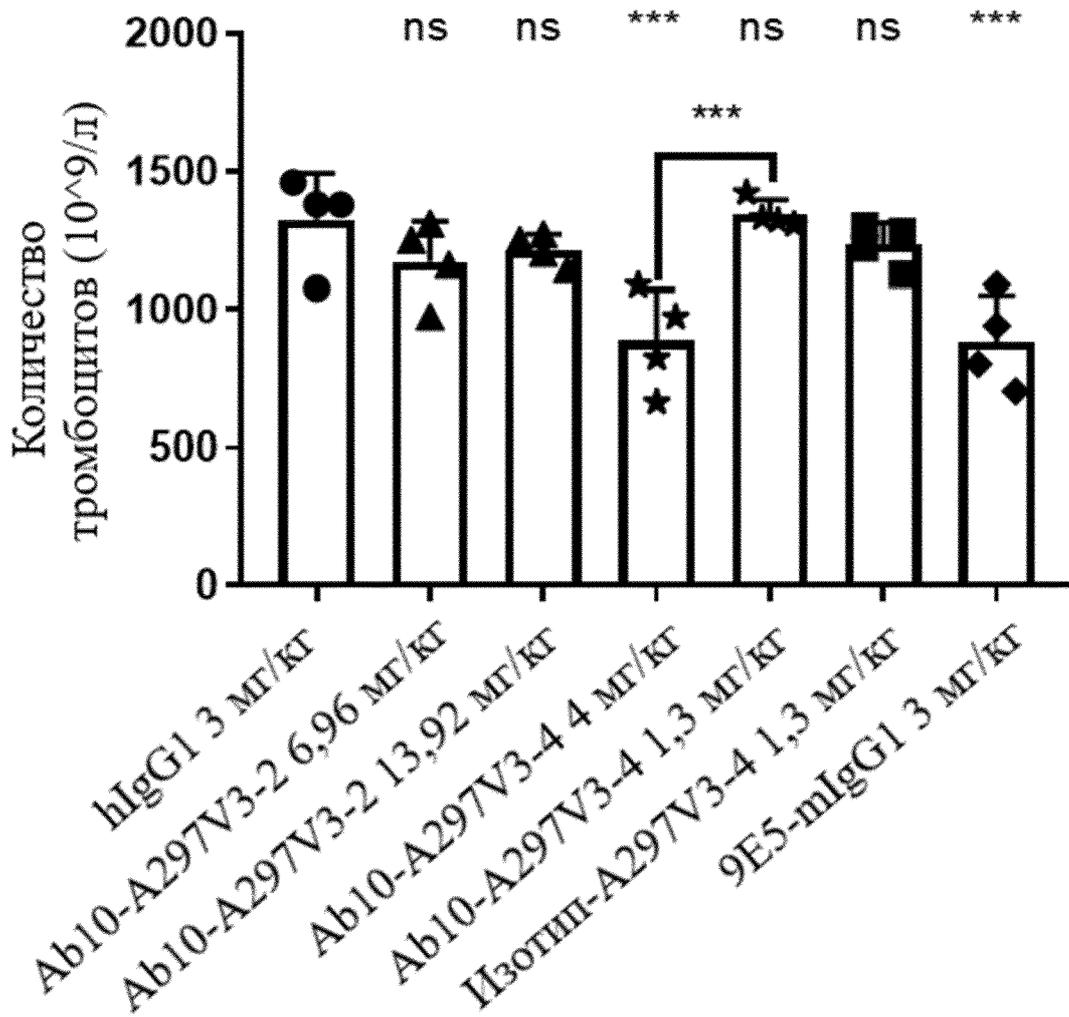
Фиг. 14А



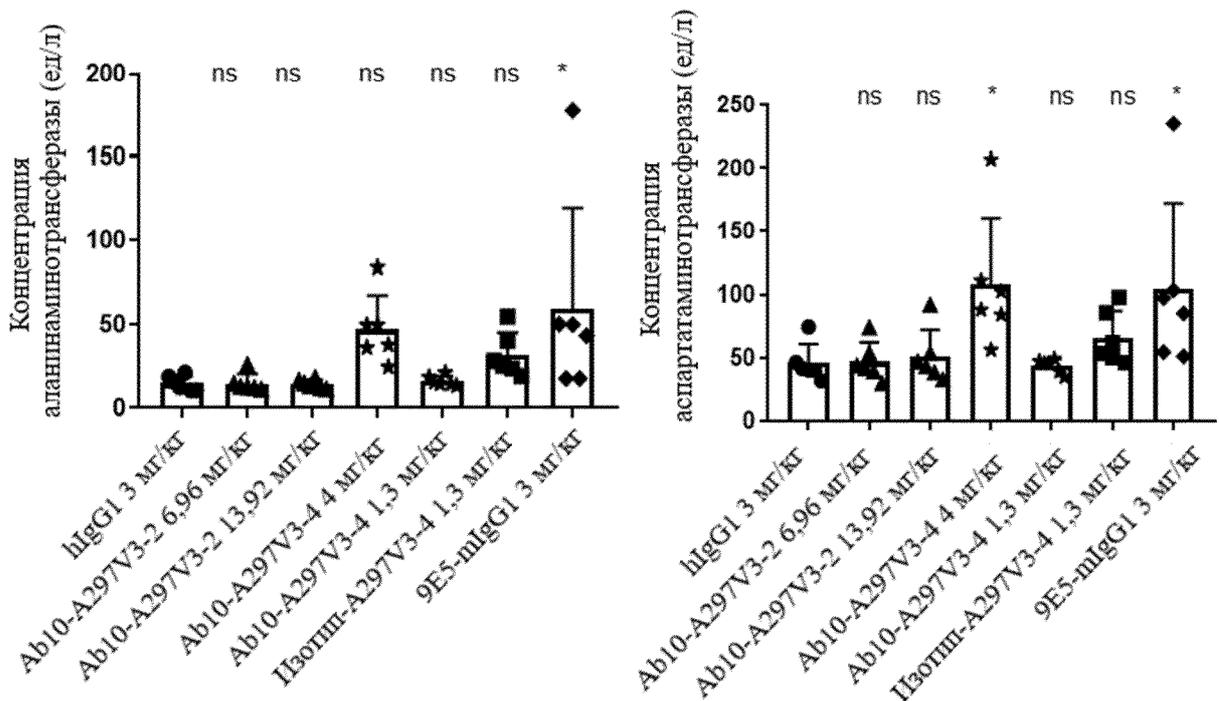
Фиг. 14В



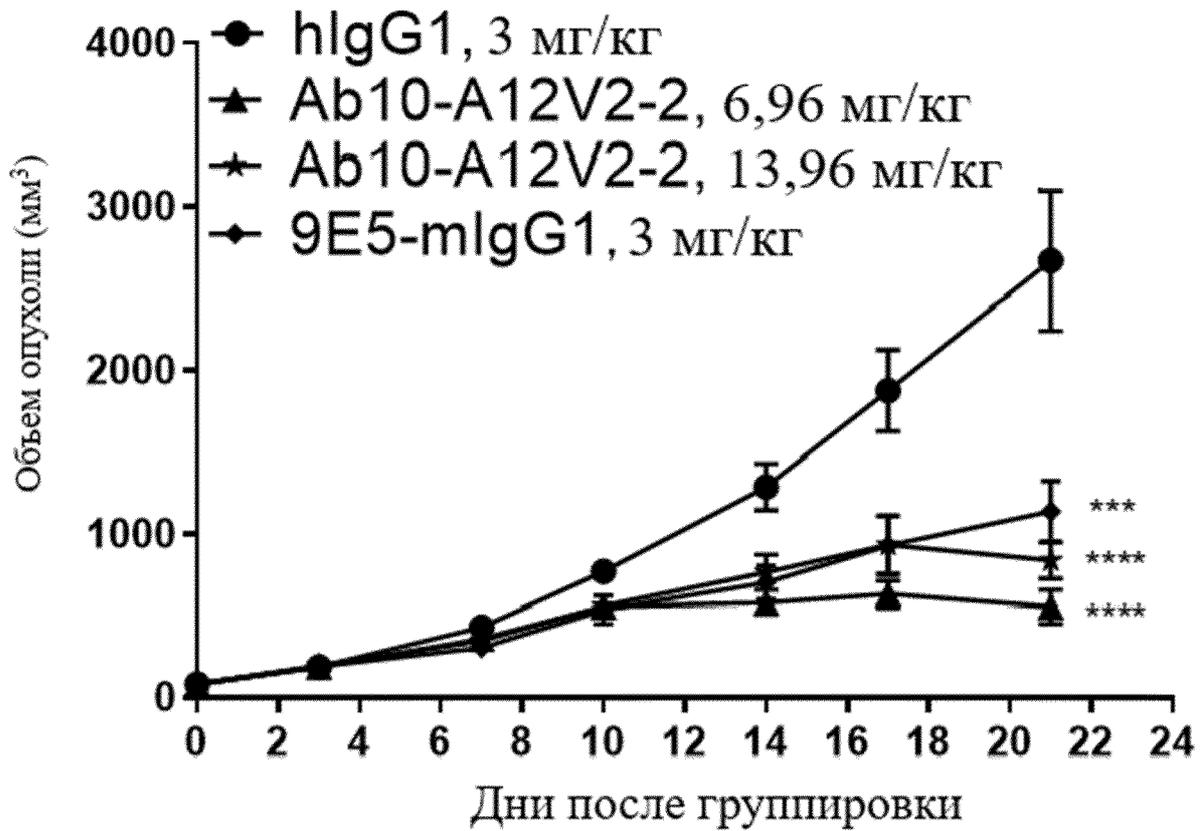
Фиг. 14С



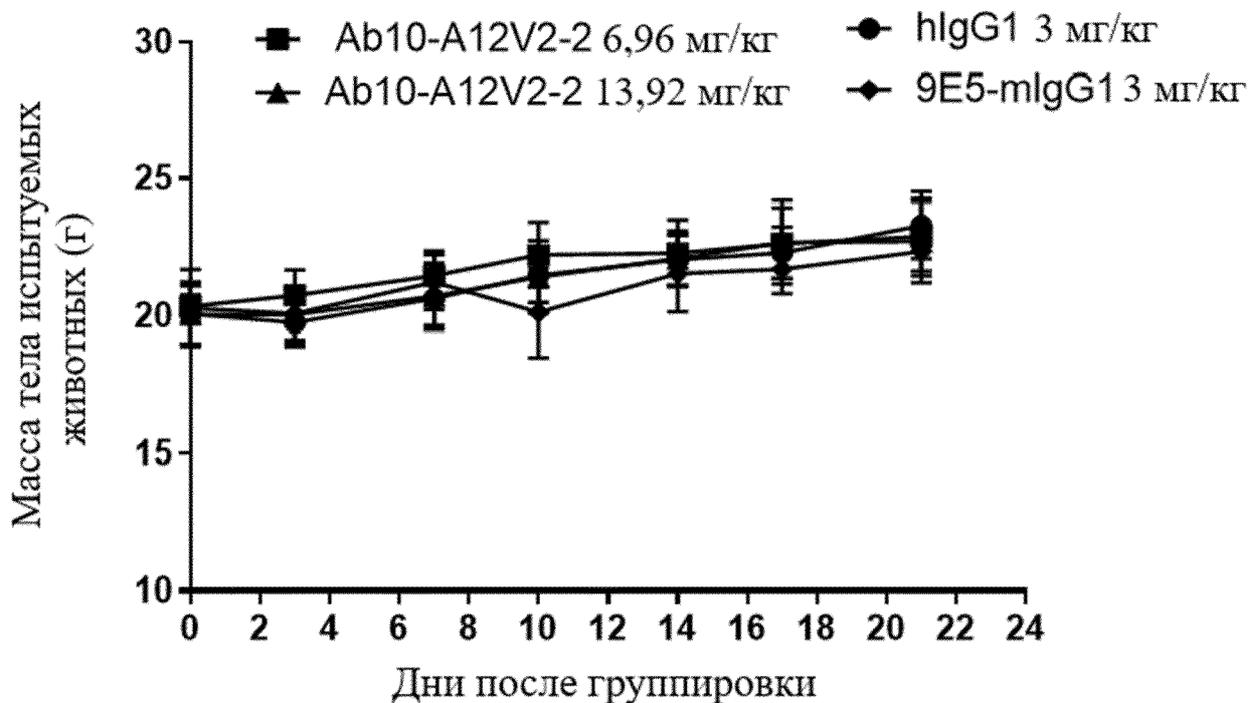
Фиг. 14D



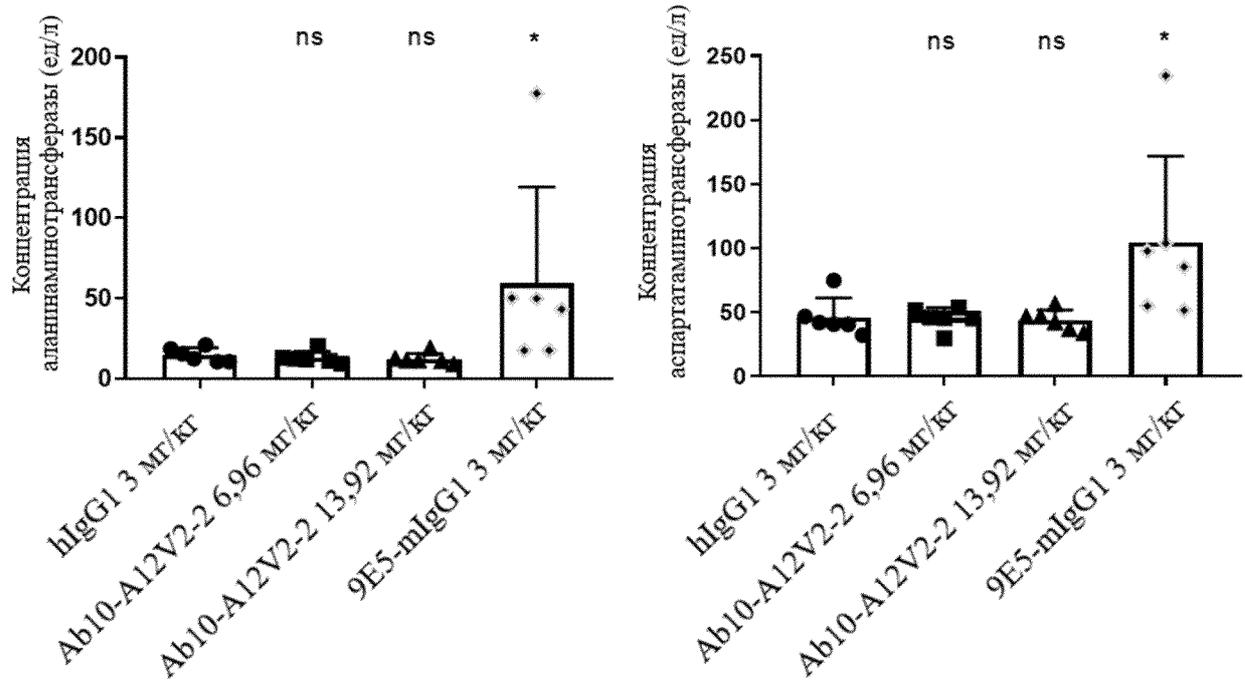
Фиг. 14E



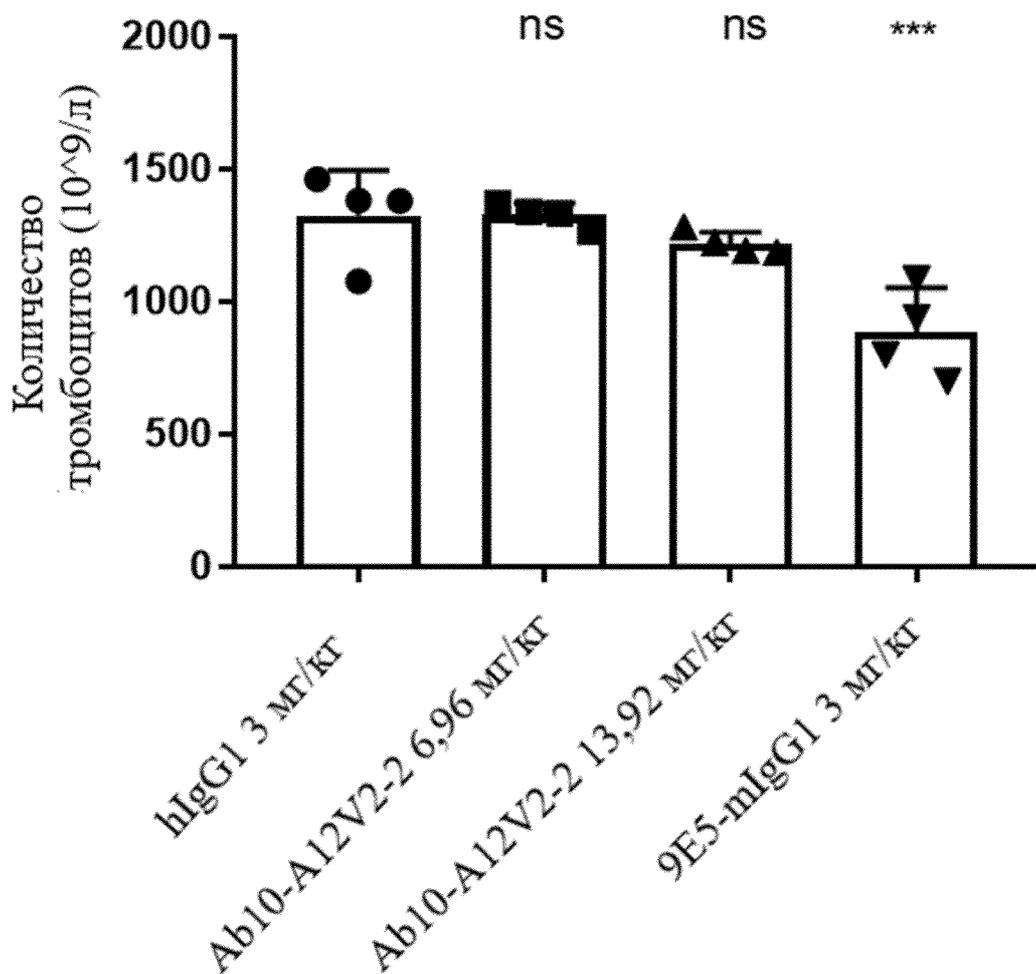
Фиг. 15А



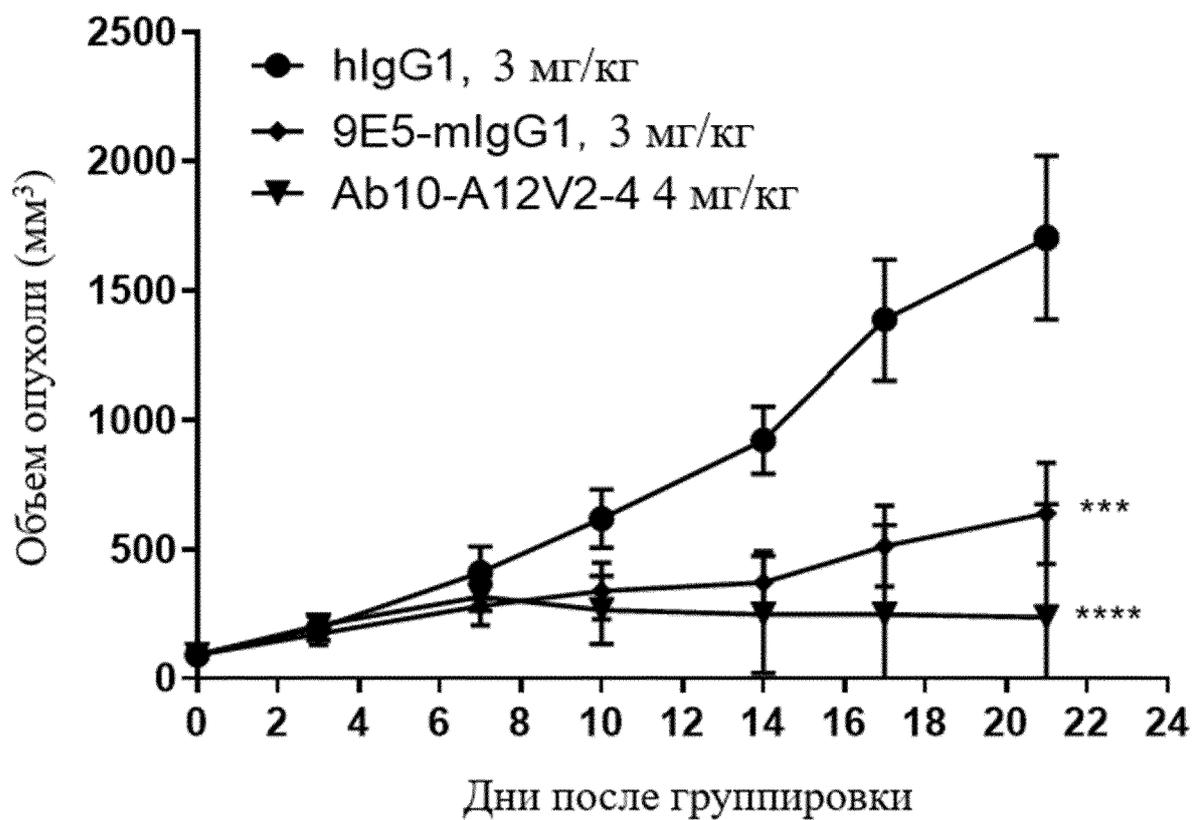
Фиг. 15В



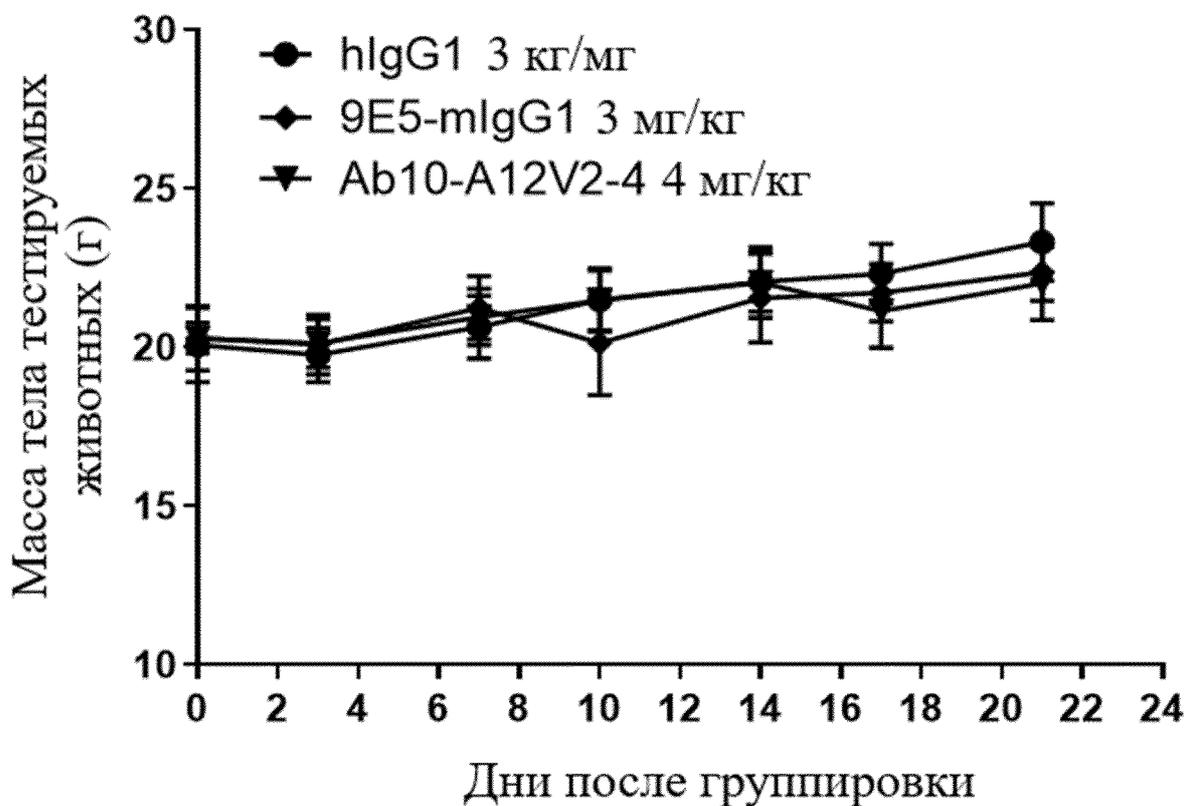
Фиг. 15С



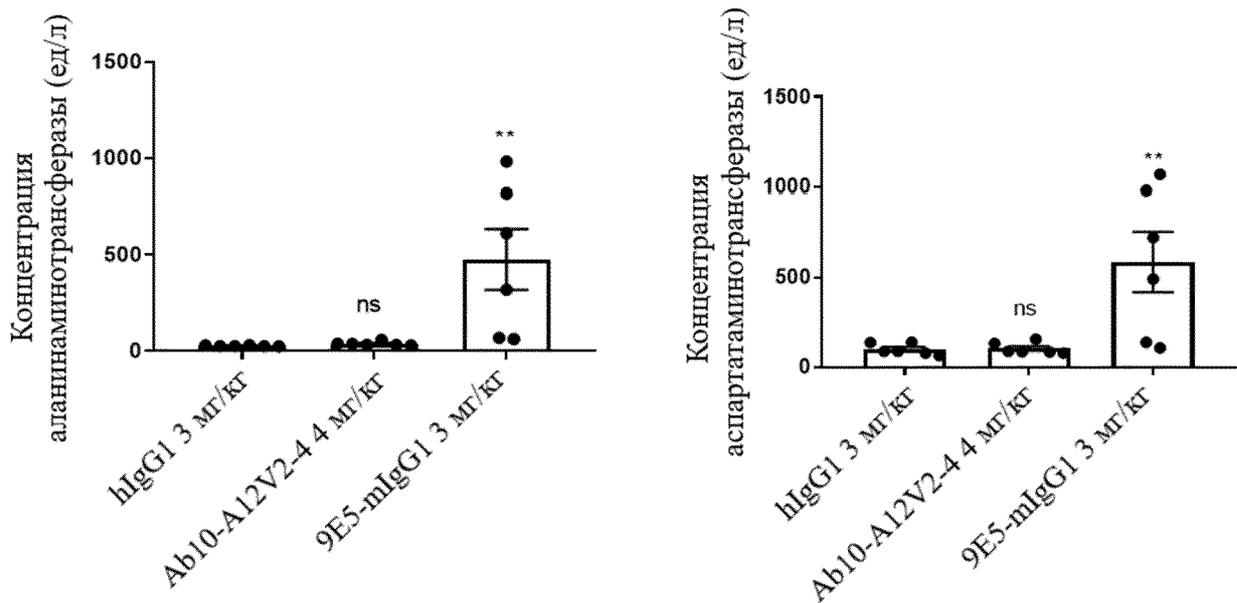
Фиг. 15D



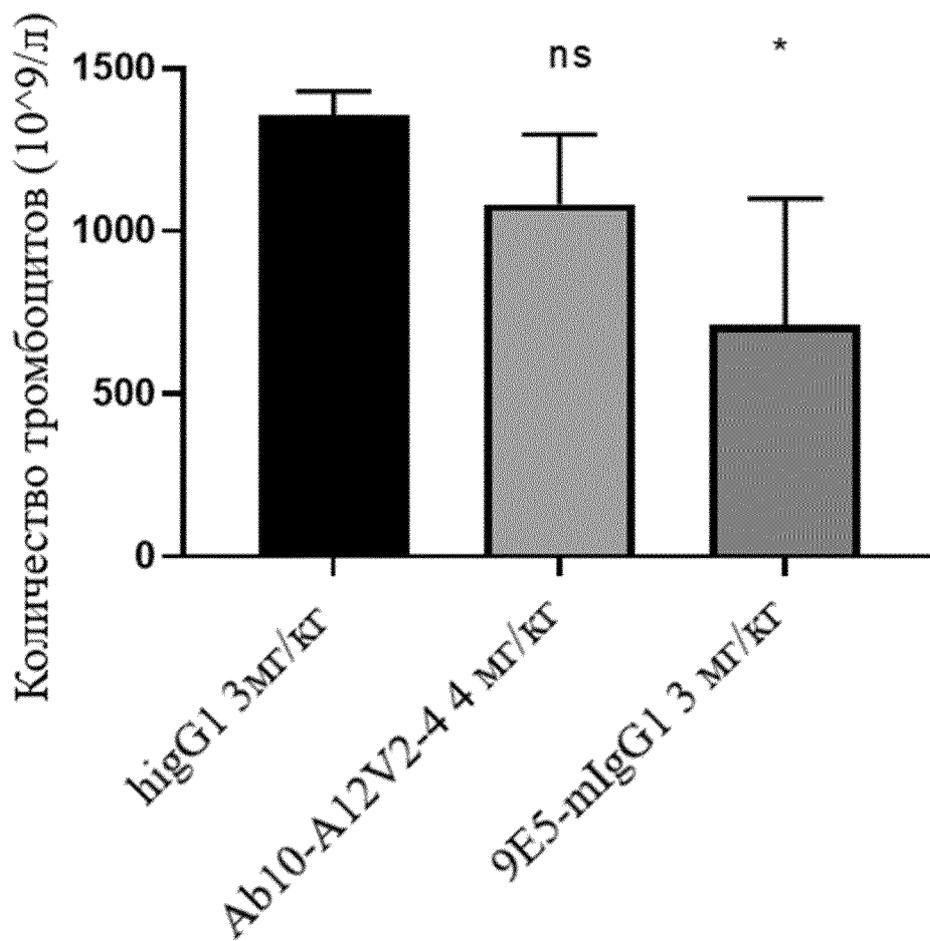
Фиг. 16А



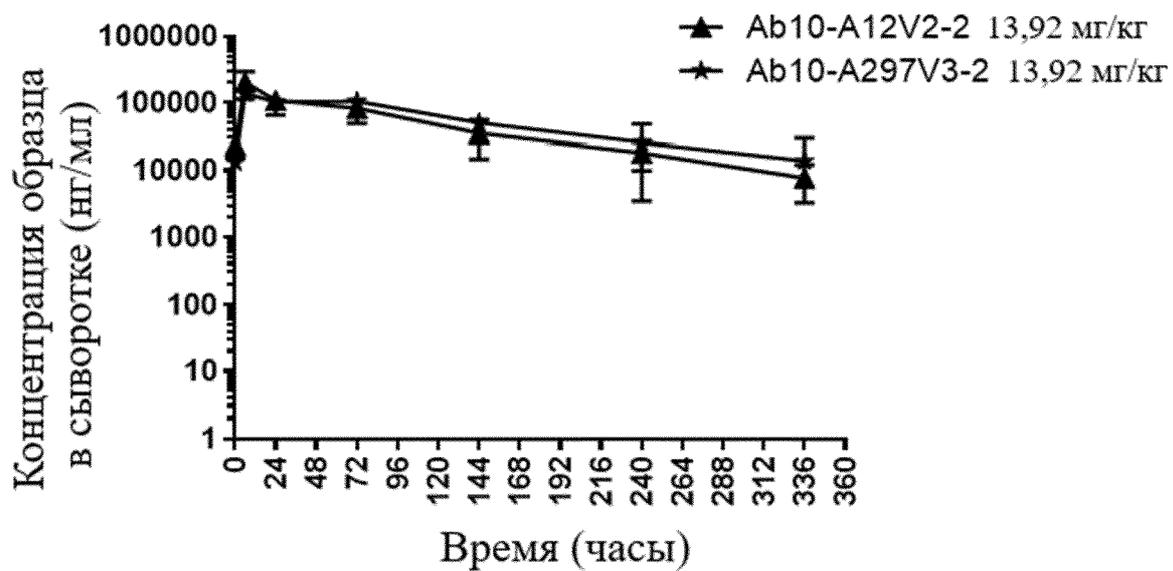
Фиг. 16В



Фиг. 16C



Фиг. 16D



Фиг. 17