

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090791** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.17

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

(22) Дата подачи заявки
2018.09.19

(54) АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD40

(31) **17191974.9**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.09.19**

**Фишер Штефан, Бекманн Карстен
(DE)**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/075388**

(74) Представитель:

(87) **WO 2019/057792 2019.03.28**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

МЭБ ДИСКАВЕРИ ГМБХ (DE)

(57) Настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором CD40 человека и индуцируют передачу сигналов CD40 независимо от Fcγ-опосредованного перекрестного связывания рецептора CD40. Антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом CD40, который перекрывается с эпитопом лиганда CD40 и может активировать APC человека. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим указанные антитела, и к применению антител и композиций при лечении пациентов, страдающих онкологическим заболеванием.

Антитело	EC50 клеточного связывания [нг/мл]
MAV-16-0262	6,3
MAV-16-0346	49,5
MAV-16-0451	8,9
MAV-16-0489	3,2
MAV-16-0484	21,9
MAV-16-0464	3,0
MAV-16-0267	3,4
MAV-16-0406	6,6
MAV-16-0400	5,8
CP-870-IgG1-LALA	14,5

202090791 A1

202090791

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561706EA/045

АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD40

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированным моноклональным агонистическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором CD40 человека и способны индуцировать передачу сигналов CD40 независимо от Fc γ -опосредованного перекрестного связывания рецепторов CD40. Изобретение также относится к применениям указанных антител и фармацевтических композиций, содержащих их.

Уровень техники

Недавний успех в иммунотерапии онкологических заболеваний возродил гипотезу о том, что иммунная система может бороться со многими, если не с большинством онкологических заболеваний, в некоторых случаях вызывая длительные реакции, чего не наблюдается при использовании многих низкомолекулярных лекарственных средств. Агонистические моноклональные антитела против CD40 (mAb) обеспечивают новый терапевтический вариант, который может генерировать противоопухолевый иммунитет с помощью различных механизмов.

CD40 - это молекула на клеточной поверхности и член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). Она широко экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки, В-клетки и моноциты, а также на многих не иммунных клетках и в ряде опухолей.

Естественным лигандом для CD40 является CD154, который экспрессируется преимущественно на поверхности активированных Т-лимфоцитов и обеспечивает основной компонент «помощи» Т-клеток для иммунных ответов: передача сигналов через CD40 на APC в значительной степени опосредует способность хелперных Т-клеток лицензировать APC. Лигирование CD40 на DC, например, индуцирует повышенную поверхностную экспрессию костимулирующих молекул и молекул MHC, продукцию провоспалительных цитокинов и усиленный запуск Т-клеток. Лигирование CD40 на покоящихся В-клетках усиливает антигенпрезентирующую функцию и пролиферацию.

Последствия передачи сигналов CD40 являются многогранными и зависят от типа клетки, экспрессирующей CD40, и микросреды, в которой обеспечивается сигнал CD40. Как и некоторые другие члены семейства рецепторов TNF, передача сигналов CD40 опосредуется адапторными молекулами, а не присущей активностью сигнальной трансдукции цитоплазматического хвоста CD40. Киназы нижних сигнальных путей активируются при сборке рецептора, происходит транслокация многокомпонентного сигнального комплекса от CD40 к цитозоли, и активируются несколько хорошо охарактеризованных путей сигнальной трансдукции.

Антагонистические человеческие антитела против CD40 известны из уровня техники. Соответствующие антагонистические антитела могут представлять собой

молчащие варианты Fc, демонстрируя уменьшенное перекрестное связывание рецептора CD40, опосредованное Fc γ . Соответствующие мутации Fc-области человеческого IgG1 описаны, например, в US 2018/0118843.

В недавно разработанных иммуномодулирующих подходах агонистические моноклональные антитела, нацеленные на CD40, (mAb), используют для усиления способности иммунной системы распознавать и разрушать опухолевые клетки. Соответствующие доклинические исследования показали, что агонистическое mAb против CD40 активирует APC и стимулирует противоопухолевые T-клеточные ответы и стимулирует цитотоксические миелоидные клетки с потенциалом для борьбы со злокачественным новообразованием в отсутствие T-клеточного иммунитета. Таким образом, агонистическое mAb против CD40 принципиально отличается от mAb, которое обеспечивает иммунную активацию путем блокирования негативных молекул контрольной точки, таких как CTLA-4 или PD-1.

CP-870,893 является первым полностью человеческим mAb IgG2, который действует как мощный и селективный агонист CD40. Интересно, что связывание CP-870,893 не конкурирует со связыванием CD154 с CD40. В доклинических исследованиях было показано, что CP-870,893 опосредует как зависимые от иммунной системы, так и независимые от нее эффекты в отношении выживаемости опухолевых клеток. В первом исследовании на людях наблюдалась многообещающая противоопухолевая активность, особенно у пациентов с меланомой. Фармакодинамически введение CP-870,893 приводит к кратковременному уменьшению В-клеток периферической крови и к положительной регуляции маркеров активации на APC.

Таким образом, агонистические mAb против CD40 представляют собой многообещающую стратегию для новых противоопухолевых терапевтических средств. Однако были также высказаны опасения относительно их потенциальных цитотоксических побочных эффектов. Агонистические моноклональные антитела против CD40 находятся в перспективе запуска синдромов высвобождения цитокинов, аутоиммунных реакций, тромбоэмболических синдромов (из-за экспрессии CD40 тромбоцитами и эндотелиальными клетками), гипериммуностимуляции, приводящих к клеточной смерти или толерантности клеток, индуцированной активацией, и ангиогенезу опухоли. Эти эффекты могут вызывать неблагоприятную токсичность или стимуляцию роста опухоли. Механистически, способность агонистических антител против CD40 и других антител, нацеленных на семейство TNF-рецепторов, взаимодействовать с Fc γ -рецепторами была связана с возникновением токсичности в исследованиях на животных (Li & Ravetch 2012, Xu et al. 2003, Byrne et al. 2016)

Для самого сильного протестированного агониста, CP-870,893, наиболее распространенным побочным эффектом, о котором сообщалось, является синдром высвобождения цитокинов, проявляющийся в виде озноба, лихорадки, дрожи и других симптомов вскоре после инфузии. Кроме того, было зарегистрировано несколько случаев тромбоэмболических осложнений с использованием CP-870,893. При использовании

дацетузаба наблюдались неинфекционные воспалительные заболевания глаз.

Следовательно, существует необходимость в создании агонистических mAb против CD40, которые проявляют пониженную клеточную токсичность, что приводит к меньшему количеству клинических побочных эффектов при сохранении их мощности и клинической эффективности. Агонистические mAb против CD40 по настоящему изобретению могут удовлетворить этой потребности, позволяя использовать полный иммуномодулирующий потенциал агонистических антител против CD40.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с рецептором CD40 человека и индуцируют передачу сигналов CD40 независимо от Fcγ-опосредованного перекрестного связывания рецепторов CD40. Более конкретно, антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом CD40, который перекрывается с эпитопом лиганда CD40 и способен активировать человеческие APC. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим указанные антитела, и к применению антител и композиций для лечения состояния или заболевания, при которых требуется стимуляция иммунной системы, например при лечении онкологических пациентов.

Определения

Термин «антитело» охватывает различные формы структур антител, включая, но не ограничиваясь ими, полноразмерные антитела и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют свойства по изобретению.

«Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которое связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димеры; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» относятся к препарату молекул антитела одного аминокислотного состава.

Термин «гуманизованное антитело» или «гуманизованная версия антитела» относится к антителам, для которых тяжелые и легкие цепи гуманизованы в результате конструирования антител. Гуманизованная цепь, как правило, представляет собой цепь, в которой аминокислотная последовательность V-области была изменена таким образом, что при анализе в целом она ближе по гомологии к последовательности зародышевой линии человека, чем к последовательности зародышевой линии вида происхождения. Оценка гуманизации основана на полученной аминокислотной последовательности, а не на методологии как таковой.

Используемые в настоящем описании термины «специфически связывающийся»,

против мишени или антитело против мишени» относятся к связыванию антитела с соответствующим антигеном (мишенью) или антиген-экспрессирующей клеткой, измеренному с помощью ИФА, где указанный ИФА предпочтительно включает покрытие соответствующего антигена на твердую подложку, добавление указанного антитела при условиях, позволяющих образование иммунного комплекса с соответствующим антигеном или белком, детектирование указанного иммунного комплекса путем измерения значений оптической плотности (OD) с использованием вторичного антитела, связывающегося с антителом в соответствии с изобретением, и использование проявки цвета, опосредованной пероксидазой.

Термин «антиген» в соответствии с изобретением относится к антигену, используемому для иммунизации, или к белку, содержащему указанный антиген, как часть его белковой последовательности. Например, для иммунизации можно использовать фрагмент внеклеточного домена белка (например, первые 20 аминокислот), а для детектирования/анализа и тому подобного можно использовать внеклеточный домен белка или полноразмерный белок.

Термин «специфически связывающийся» или «специфически распознаваемый» в настоящем описании означает, что антитело проявляет заметную аффинность к антигену и, предпочтительно, не проявляет значительной перекрестной реактивности.

Антитело, которое «не проявляет значительной перекрестной реактивности», является антителом, которое не будет заметно связываться с другим нежелательным белком. Специфическое связывание может быть определено в соответствии с любыми известными в данной области средствами для определения такого связывания, например, методами конкурентного связывания, такими как ИФА.

«Антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и эталонное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, эталонное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% и более.

Термин «вариабельная область (или домен) антитела по изобретению» (вариабельная область легкой цепи (VL), вариабельная область тяжелой цепи (VH)) в контексте настоящего описания обозначает каждую из пары областей легкой и тяжелой цепи, которые непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждая область содержит четыре каркасные (FR) области, последовательности которых являются консервативными, соединенными тремя областями, определяющими комплементарность, CDR.

Термин «антигенсвязывающая часть антитела» при использовании в настоящем описании относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Антигенсвязывающая часть антитела предпочтительно содержит аминокислотные остатки из «областей, определяющих комплементарность» или «CDR». Последовательности CDR определены в соответствии с Kabat et al., Sequences of Proteins

of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее или дополнительное количество аминокислот, соответствующее укорочению или вставке в FR или CDR варибельной области. Например, варибельная область тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков согласно Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания по областям гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, пронумерованной согласно Kabat.

«Константные домены (константные части)» не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют, например, также эффекторные функции. Фрагмент гена константной области тяжелой цепи, который соответствует человеческому IgG1, называется $\gamma 1$ -цепью. Фрагмент гена константной области тяжелой цепи, который соответствует человеческому IgG3, называется $\gamma 3$ -цепью. Человеческие константные области γ тяжелой цепи подробно описаны в Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), и в Brueggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527.

Термин «область Fc» используется в настоящем описании для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит, по меньшей мере, часть константной области. Термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты областей Fc.

Если в настоящем описании не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области осуществляется в соответствии с системой нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

«Вариант Fc-области» включает аминокислотную последовательность, которая отличается от «нативной» последовательности или последовательности «дикого типа» Fc-области по меньшей мере одной «аминокислотной модификацией», как определено в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин «Fc-вариант» относится к полипептиду, содержащему модификацию в Fc-домене. Модификация может быть добавлением, делецией или заменой. Замены могут включать природные аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислоты. Варианты могут содержать не встречающиеся в природе аминокислоты.

Термин «полипептид, содержащий Fc-область», относится к полипептиду, такому как антитело, которое содержит Fc-область.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора,

который связывается с Fc-областью антитела. FcR, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор), включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются, главным образом, их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор в Daeron, M., *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 203-234). FcR рассматриваются в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel et al. *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; и в de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-41. Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются термином «FcR» в настоящем описании. Термин также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117 (1976) 587 и Kim et al., *J. Immunol.* 24 (1994) 249).

Под «Fc-лигандом IgG» в контексте настоящего описания подразумевается молекула, предпочтительно полипептид, из любого организма, который связывается с Fc-областью антитела IgG с образованием комплекса Fc/Fc-лиганд. Fc-лиганды включают, но не ограничиваются ими, FcγR, FcRn, Clq, C3, лектин, связывающий маннозу, рецептор маннозы, стафилококковый протеин A, стрептококковый протеин G и вирусный FcγR. Fc-лиганды также включают гомологи Fc-рецепторов (FcRH), которые представляют собой семейство Fc-рецепторов, которые гомологичны FcγR (Davis, et al., *Immunological Reviews* 190 (2002) 123-136, полностью включены в качестве ссылки). Fc-лиганды могут включать в себя неоткрытые молекулы, которые связывают Fc. Конкретными IgG Fc-лигандами являются FcRn и Fc гамма-рецепторы. Под «Fc-лигандом» в контексте настоящего описания подразумевается молекула, предпочтительно полипептид, из любого организма, который связывается с Fc-областью антитела с образованием комплекса Fc/Fc-лиганд.

Под «Fc гамма-рецептором», «FcγR» или «FcγgammaR» в контексте настоящего описания подразумевается любой член семейства белков, которые связываются с Fc-областью антитела IgG и кодируются геном FcγR. У людей это семейство включает, но не ограничивается ими, FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIA, FcγRIB и FcγRIC; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIA (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIB (включая FcγRIIB-1 и FcγRIIB-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIA (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIB-NA1 и FcγRIIB-NA2) (Jefferis, et al., *Immunol Lett* 82 (2002)), а также любые неизвестные человеческие FcγR или изоформы или аллотипы FcγR. FcγR может быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь этим, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. FcγR мыши включают, но не ограничиваются ими, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD 16) и FcγRIII-2 (CD 16-

2), а также любые неизвестные мышинные Fc γ R или изоформы или аллотипы Fc γ R.

Используемый в настоящем описании термин «FcRn» или «неонатальный Fc-рецептор» относится к белку, который связывается с Fc-областью антитела IgG и кодируется по меньшей мере частично геном FcRn. FcRn может быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь этим, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Как известно в данной области, функциональный белок FcRn содержит два полипептида, которые часто называют тяжелой цепью и легкой цепью. Легкая цепь представляет собой бета-2-микроглобулин, а тяжелая цепь кодируется геном FcRn. Если в настоящем описании не указано иное, FcRn или белок FcRn относится к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к пептидной или полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательности и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности и не предполагая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR).

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcR (например, клетки-натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело в клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в Таблице 3 на странице 464 Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9 (1991) 457-492.

Термины «антителозависимый клеточный фагоцитоз» и «ADCP» относятся к процессу, посредством которого покрытые антителами клетки интернализуются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с Fc-областью иммуноглобулина.

Используемый в настоящем описании термин «эффекторная функция(функции) антитела» или «эффекторная функция» относится к функции, обеспечиваемой эффекторным доменом(доменами) Fc IgG (например, Fc-областью иммуноглобулина). Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания эффекторного

домена(доменов) Fc с рецептором Fc на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или путем связывания эффекторного домена(доменов) Fc с компонентами системы комплемента. Типичными эффекторными функциями являются ADCC, ADCP и CDC.

«C1q» представляет собой полипептид, который включает сайт связывания для Fc-области иммуноглобулина. C1q вместе с двумя сериновыми протеазами, C1r и C1s, образует комплекс C1, первый компонент пути комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, которым обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно.

«Эффективное количество» агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

Используемый в настоящем описании термин «злокачественное новообразование» может представлять собой, например, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, прогрессирующую карциному поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак матки, карциному маточных труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточную карциному, карциному почечной лоханки, мезотелиому, гепатоцеллюлярный рак, билиарный рак, опухоли центральной нервной системы (ЦНС), опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, мультиформную глиобластому, астроцитому, шваному, эпендимому, медуллобластому, менингиому, плоскоклеточный рак, аденому гипофиза, лимфому, лимфоцитарный лейкоз, в том числе рефрактерные варианты любого из вышеперечисленных видов рака или комбинацию одного или более из вышеуказанных видов рака.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение удовлетворяет потребности создания агонистических mAb против CD40, которые проявляют пониженную клеточную токсичность, приводя к

меньшему количеству клинических побочных эффектов, в то время как их сигнальная активность и клиническая эффективность, по меньшей мере, сохраняется, если не повышается, по сравнению с агонистическими антителами против CD40 предшествующего уровня техники.

Антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обеспечивают эти полезные свойства, поскольку они способны специфически связываться с человеческим рецептором CD40 и индуцировать передачу сигналов CD40 независимо от Fc γ -опосредованного перекрестного связывания рецептора CD40.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению представляют собой гуманизированные антитела IgG1LALA, гуманизированные антитела IgG1-типа, имеющие по меньшей мере две аминокислоты аланина в положениях 234 и 235 Fc1-области человека. Таким образом, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления IgG1LALA содержит мутации L234A и L235A Fc1-области человека.

Еще более предпочтительно, чтобы антитела по изобретению представляли собой рекомбинантные молекулы.

Настоящим изобретением предусмотрено, что агонистическое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с человеческим рецептором CD40 и индуцировать передачу сигналов CD40 независимо от Fc γ -опосредованного перекрестного связывания рецептора CD40 (см. также Пример 5, Фиг. 6 и текст ниже). Кроме того, антитело в соответствии с настоящим изобретением может проявлять пониженную или истощенную сигнальную способность через Fc γ -рецептор человека по сравнению с передачей сигналов Fc γ -рецептором IgG дикого типа или передачей сигналов Fc γ -антител предшествующего уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления агонистические моноклональные антитела против CD40 по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут проявлять пониженную или истощенную аффинность к человеческим Fc γ -рецепторам по сравнению с Fc γ IgG дикого типа. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения антитела по изобретению не связываются с рецепторами Fc γ , соответственно, антитела по изобретению не запускают Fc γ -опосредованное перекрестное связывание рецептора CD40.

В предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению содержат по меньшей мере аминокислотные замены в L234A и L235A Fc-области человеческого IgG1 или S228P и L235E Fc-области человеческого IgG4.

Для настоящего изобретения также предпочтительно, чтобы антитела связывались с эпитопом CD40, который перекрывается с сайтом связывания CD40L. Фигуры 3 и 16 демонстрируют это эпитопное перекрывание для протестированных гуманизированных антител против CDG IgG1-LALA. Также предпочтительным является то, что антитела CD40 конкурируют с CD40L за связывание с рецептором CD40. Таким образом, в анализах на конкуренцию эпитопов антитела по изобретению конкурируют с CD40L.

Такие анализы описаны в Примерах 3 и 11, а результаты экспериментов с антителами по изобретению представлены на Фигурах 3 и 16. Таким образом, в соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления антитела по изобретению ингибируют связывание CD40L с рецептором CD40. Фигура 19 демонстрирует, что антитела по изобретению не конкурируют с CP-870,893 за связывание с CD40.

Антитела по изобретению обладают очень высокой связывающей активностью с рецептором CD40. Следовательно, в клеточном анализе связывания, как описано в Примере 1, антитела по изобретению проявляют активность связывания с EC50, составляющей по большей мере 49,5 нг/мл. Предпочтительно EC50 составляет менее чем 25 нг/мл, более предпочтительно менее чем 15 нг/мл, менее чем 9 нг/мл, 7 нг/мл, 6 нг/мл, 5 нг/мл, 4 нг/мл. Наиболее предпочтительно, чтобы EC50 составляла 3 нг/мл в клеточном анализе связывания, как описано в Примере 1 и как изображено на Фигуре 1.

Гуманизированные агонистические антитела против CD40 по изобретению могут характеризоваться биохимическими аффинностями к растворимому тримерному белку CD40 человека или яванской макаки (ср. Пример 13; Фигура 18). Антитела по изобретению могут демонстрировать значения KD, равные или менее чем 15,7 нМ для CD40 человека. Антитела по изобретению могут вступать в перекрестную реакцию с белком CD40 яванской макаки со значением KD, равным или менее чем 10,3 нМ.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению способны индуцировать клеточную передачу сигналов NF-κB с высокой активностью. Краткое содержание экспериментов (ср. Пример 2) изображено на Фигуре 2, где показаны значения связывания EC50 в диапазоне от 1127 до 6243 нг/мл. Значения EC50 демонстрируют высокую эффективность антител в отношении индукции передачи сигналов NF-κB.

Также следует понимать, что антитела по изобретению могут связываться с CD40 яванской макаки. Активность связывания гуманизированных моноклональных антител IgG1-LALA против CD40 яванской макаки (*Macaca fascicularis*) показана в экспериментах ИФА с использованием рекомбинантного белка CD40 яванской макаки (ср. Пример 4). Значения EC50, показанные на Фиг.4, указывают на сильное связывание антител.

Другой характеристикой антител по настоящему изобретению является то, что они могут активировать APC человека. Например, антитела могут активировать клетки, выбранные из группы, включающей дендритные клетки (DC), В-клетки, моноциты и миелоидные клетки. Предпочтительно антитела активируют DC.

Эта сильная агонистическая активность CD40 в активации APC не обусловлена опосредованным Fcγ-рецептором перекрестным связыванием белков CD40 (ср. Результаты экспериментов, приведенные на Фиг. 5, 6 и 7 и описанные в Примере 5).

По существу, в одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению индуцируют высвобождение IL-12p40 в анализе созревания дендритных клеток, как описано в Примере 5. Результаты экспериментов, проведенных с антителами по настоящему изобретению в таком анализе, показаны на Фигурах 5-7.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления

изобретения антитела по изобретению индуцируют созревание антигенпрезентирующих клеток, что определяется высвобождением IL12p70, которое, по меньшей мере, равно высвобождению, которое индуцируется при стимуляции антителом CP-870,893-IgG2, и при значении EC50, равном или менее чем 208 нг/мл (Фиг. 12 и 14). Кроме того, антитела по изобретению индуцируют созревание антигенпрезентирующих клеток, что определяется по индукции CD86 по меньшей мере в 7,5 раз и при значении EC50, равном или менее чем 148 нг/мл (Фиг. 11 и 13).

Предпочтительно антитела индуцируют высвобождение IL12p40 из DC, происходящих из моноцитов, которое по меньшей мере равно высвобождению, которое индуцируется при стимуляции антителом CP-870,893-IgG2 (ср. Фиг.6). Как говорилось ранее, этот потенциал индукции созревания DC не связан с передачей сигналов через Fc-рецепторы. Гуманизированные моноклональные антитела IgG1-LALA против CD40 по изобретению потенциально индуцируют активацию дендритных клеток, полученных из моноцитов, независимо от рецептора Fcγ (см. Пример 5 и Фиг. 6). На Фиг.6 показано, что уровни высвобождения IL12p40, индуцированные вариантами CP-870,893, коррелируют со способностью вариантов связывать Fc-рецепторы (IgG1-LALA < IgG2 < IgG1 < IgG1-V11). Поразительно, что стимуляция гуманизированными моноклональными антителами IgG1-LALA против CD40 по изобретению приводила к Fc-независимым уровням секреции IL12p40, которые покрывали и даже превышали диапазон, полученный с вариантами CP-870,893. Таким образом, антитела против CD40 по изобретению обеспечивают мощную агонистическую активность в отношении первичных дендритных клеток, происходящих из моноцитов, без опосредованного Fc-рецептором перекрестного связывания белков CD40.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению очень специфичны по своей активации. Они не вызывают общего высвобождения воспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа (ср. Пример 6 и Фиг. 8).

Другой характеристикой антител по настоящему изобретению является пониженный клиренс антител с поверхности клетки. Известно, что CP-870,893 интернализуется после связывания с рецептором CD40 на клетках. Клинические исследования показали, что CP-870,893 быстро выводится из кровообращения у пациентов с предполагаемым периодом полужизни менее чем 6 часов, что отражает большое снижение рецепторов CD40 у пациентов, которое может быть вызвано клеточной интернализацией (Rüter et al 2010).

Антитела по изобретению удерживаются на поверхности клетки в условиях, обеспечивающих эндоцитоз и интернализацию (ср. Пример 7 и Фиг. 9). Напротив, варианты CP-870,893 не сохраняются на поверхности клетки в условиях, допускающих эндоцитоз и интернализацию (Фиг. 9).

Понятно, что антитела по изобретению оказывают косвенный (иммуноопосредованный) эффект на гибель опухолевых клеток. Таким образом, антитела проявляют косвенный опосредованный иммунными клетками цитотоксический эффект в

отношении опухолевых клеток.

В одном конкретном варианте осуществления антитела по изобретению не приводят к истощению иммунных клеток, экспрессирующих CD40, с помощью механизмов ADCC, ADCP или CDC.

Таким образом, в целом, антитела по изобретению могут быть дополнительно охарактеризованы следующим:

- (a) не связываются с рецептором Fcγ;
- (b) имеют аффинность связывания CD40 с клетками при значении EC50, равном или менее чем примерно 49,5 нг/мл;
- (c) имеют значения KD, равные или менее чем примерно 15,7 нМ;
- (d) перекрестно-реактивны с CD40 яванской макаки со значением KD, равным или менее чем примерно 10,3 нМ;
- (e) ингибируют CD40L путем связывания с CD40;
- (f) предотвращают синергетические и аддитивные эффекты CD40L-опосредованных функций;
- (g) индуцируют созревание антигенпрезентирующих клеток, определяемое высвобождением IL12p70, которое, по меньшей мере, равно высвобождению, которое индуцируется при стимуляции антителом CP-870,893-IgG2 и со значением EC50, равным или менее чем примерно 208 нг/мл.
и/или как определено по индукции CD86 на дендритных клетках, по меньшей мере, в 7,5 раз и с EC50, равным или менее чем примерно 148 нг/мл; и/или
- (h) снижают уровень CD40 на поверхности клетки в меньшей степени, чем CP-870,893.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения антитела по изобретению характеризуются тем, что они обладают по меньшей мере одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью или восемью или всеми вышеуказанными свойствами (a-h).

Благодаря благоприятным свойствам антител по изобретению они способны ингибировать рост опухолей человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению может содержать область VH, выбранную из группы областей VH, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1H SEQ ID NO: 29+n, области CDR2H SEQ ID NO: 43+n и области CDR3H SEQ ID NO: 57+n, где n представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13, и область VL, выбранную из группы областей VL, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1L SEQ ID NO: 71+m, области CDR2L SEQ ID NO: 85+m и области CDR3L SEQ ID NO: 99+m, где m представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13, и где CDR могут содержать любую одну или более аминокислотных мутаций, которые не снижают их активность в соответствии с изобретением.

Предпочтительно антитело содержит область VH, выбранную из группы областей

VH, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1H SEQ ID NO: 29+n, области CDR2H SEQ ID NO: 43+n и области CDR3H SEQ ID NO: 57+n, где n представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13, и область VL, выбранную из группы областей VL, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1L SEQ ID NO: 71+m, области CDR2L SEQ ID NO: 85+m и области CDR3L SEQ ID NO: 99+m, где m представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению может содержать область VH, выбранную из группы областей VH, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1H SEQ ID NO: 29+n, области CDR2H SEQ ID NO: 43+n и области CDR3H SEQ ID NO: 57+n, и область VL, выбранную из группы, состоящей из областей VL, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1L SEQ ID NO: 71+n, области CDR2L SEQ ID NO: 85+n и области CDR3L SEQ ID NO: 99+n, где n представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13, и где CDR могут содержать любой одну или более аминокислотных мутаций, которые не снижают их активность согласно изобретению.

Предпочтительно, CDR имеют идентичность последовательности с их соответствующими SEQ ID NO, по меньшей мере, 91%, предпочтительно 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

В другом варианте осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 60% идентична, предпочтительно по меньшей мере на 70% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична области VH, выбранной из группы, состоящей из областей VH SEQ ID NO: 1-14.

Предпочтительно указанные антитела содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), имеющую, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей VH SEQ ID NO: 1-14.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH имеет, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, благодаря чему антитело сохраняет способность специфически связываться в соответствии с изобретением с соответствующим антигеном.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 1-14.

Предпочтительно последовательность вариабельной области (VH) тяжелой цепи

представляет собой SEQ ID NO: 1, альтернативно SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14,

Настоящее изобретение также относится к антителу, которое содержит переменную область легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 60% идентична, предпочтительно по меньшей мере на 70% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 80% идентична, более предпочтительно по меньшей мере на 85% идентична области VL, выбранной из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 15-28.

Предпочтительно указанные антитела содержат последовательность VL, имеющую, по меньшей мере, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы последовательностей VL SEQ ID NO: 15-28.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL имеет, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, благодаря чему антитело сохраняет способность специфически связываться в соответствии с изобретением с соответствующим антигеном.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, которое содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 15-28.

Предпочтительно последовательность переменной области легкой цепи (VL) представляет собой SEQ ID NO: 15, альтернативно SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления в указанных последовательностях VL было замещено, вставлено и/или удалено всего от 1 до 10 аминокислот. В других вариантах осуществления в указанных последовательностях VH было замещено, вставлено и/или удалено всего от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления в каждой из указанных последовательностей VH или VL было замещено, вставлено и/или удалено всего от 1 до 10 аминокислот. Указанные замены, вставки или делеции могут происходить в областях за пределами CDR (то есть в FR).

Изобретение также включает аффинно-зрелые антитела, которые могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области. Marks et al. *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) описывают созревание аффинности путем перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или каркасных остатков описан: Barbas et al., *Proc Nat. Acad. Sci, США* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992) и WO 2010/108127.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, которое содержит область VH и область VL, содержащую соответствующие области CDR1, CDR2 и CDR3 антител, выбранных из группы, содержащей антитела, перечисленные на Фиг. 10, то есть содержащей антитела MAB-16- 0283, MAB-16-0377, MAB-16-0267, MAB-16-0386, MAB-16-0451, MAB-16-0346, MAB-16-0325, MAB-16-0388, MAB-16-0464, MAB-16-0262, MAB-16-0406, MAB-16-0484, MAB-16-0400, MAB-16-0489.

Настоящее изобретение также охватывает антитело, которое содержит область VH и область VL, содержащие соответствующие области CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, выбранного из группы, содержащей антитела, перечисленные на Фиг. 10, то есть содержащей антитела MAB-16- 0283, MAB-16-0377, MAB-16-0267, MAB-16-0386, MAB-16-0451, MAB-16-0346, MAB-16-0325, MAB-16-0388, MAB-16-0464, MAB-16-0262, MAB-16-0406, MAB-16-0484, MAB-16-0400, MAB-16-0489. Антитело согласно изобретению также может содержать SEQ ID NO: 3 и 17, или SEQ ID NO: 4 и 18, или SEQ ID NO: 5 и 19, или SEQ ID NO: 6 и 20, или SEQ ID NO: 7 и 21, или SEQ ID NO: 8 и 22, или SEQ ID NO: 9 и 23, или SEQ ID NO: 10 и 24, или SEQ ID NO: 11 и 25 или SEQ ID NO: 12 и 26. Альтернативно, антитело по изобретению содержит SEQ ID NO: 13 и 27 или SEQ ID NO: 14 и 28.

В другом аспекте антитела по изобретению предназначены для применения при лечении пациентов, имеющих онкологическое заболевание.

Указанное онкологическое заболевание может представлять собой один или более типов рака, выбранных из группы, включающей рак поджелудочной железы, прогрессирующую карциному легкого, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярный рак легкого, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак почки, лимфому Ходжкина, рак печени, рак желчного пузыря, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак слюнной железы или рак матки.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления также возможно, что злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование, экспрессирующее CD40. Однако это не является необходимым для эффективного функционирования антител по изобретению.

Кроме того, следует понимать, что антитело по изобретению может использоваться в качестве единственного средства лечения злокачественного новообразования у пациента или в качестве части комбинированного лечения (которое может представлять собой фармацевтическое цитотоксическое или цитостатическое средство, лучевую терапию, терапию направленного действия и/или хирургию).

Таким образом, пациент также может получать одно или более дополнительных

способов лечения злокачественного новообразования, например, фармацевтические агенты (такие как цитотоксические или цитостатические агенты, терапия направленного действия), лучевая терапия и/или хирургия.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению используется при лечении злокачественного новообразования в комбинации с цитотоксическими или цитостатическими агентами, лучевой терапией, терапией направленного действия и/или иммунотерапией.

Антитела по изобретению также можно использовать при лечении пациентов, которые недостаточно реагируют и/или устойчивы к цитотоксическим или цитостатическим агентам, лучевой терапии, терапии направленного действия и/или иммунотерапии.

Указанная лучевая терапия может быть выбрана из группы, включающей наружную лучевую терапию дистанционного действия, контактную рентгеновскую брахитерапию, брахитерапию, системную радиоизотопную терапию или интраоперационную лучевую терапию.

Цитотоксические или цитостатические противоопухолевые агенты согласно изобретению могут быть из группы, включающей таксаны, антрациклины, алкилирующие агенты, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы киназы, аналоги нуклеотидов, пептидные антибиотики и агенты на основе платины.

Предпочтительно противоопухолевые агенты направленного действия используют в терапии направленного действия и выбирают из одного из следующих или их комбинаций: соединений против EGFR, таких как цетуксимаб, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, панитумумаб, соединений против HER2, таких как трастузумаб, адотрастузумабемтанзин, пертузумаб, VEGF-направленных соединений, таких как бевацизумаб, афлиберцепт и пегалтаниб, и ингибиторов тирозинкиназы, таких как сунитиниб, пазопаниб, акситиниб, вандетаниб, кабозантиниб и регорафиниб.

В случае если пациенты получают иммунную терапию, это может быть ингибирование иммунной контрольной точки, и может использоваться один или более ингибиторов иммунной контрольной точки. Один или более ингибиторов иммунной контрольной точки могут быть выбраны из группы, включающей анти-PD-L1, анти-PD-1, анти-CTLA-4, анти-CD137, анти-LAG-3, анти-TIM-3, анти-OX40 и/или анти-GITR.

Антитело по изобретению также можно использовать в комбинации с антителом, которое специфически связывается с человеческим PD-L1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CD137, OX40, GITR и/или в комбинации с лекарственным средством ниволумаб, пембролизумаб, урелумаб, утомилумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, тремелимумаб, ипилимумаб.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с изобретением антитело используется при лечении злокачественного новообразования с еженедельной или ежемесячной схемой дозирования.

Одним из особых преимуществ этого изобретения является то, что из-за их

мутаций в Fc-области антитела проявляют меньшую дозоограничивающую токсичность или токсичность, обусловленную терапией, по сравнению с антителами предшествующего уровня техники. Антитела провоцируют типичные побочные эффекты антител против CD40, если они вообще имеют место, только в очень ограниченной степени. Такими побочными эффектами являются состояния, выбранные из группы, включающей синдром высвобождения цитокинов, тромбоз, церебральную эмболию, повышение уровня трансаминаз, лимфопению, усталость, периферическую невропатию, алопецию, запор, тошноту и нейтропению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела по изобретению.

Фармацевтическая композиция по изобретению может быть использована при лечении пациентов, имеющих злокачественное новообразование. Такое злокачественное новообразование может быть солидной опухолью. Злокачественное новообразование также может быть выбрано из группы, включающей рак поджелудочной железы, прогрессирующую карциному легкого, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхиоальвиолярный рак легкого, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак почки, лимфому Ходжкина, рак печени, рак желчного пузыря, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак слюнной железы или рак матки.

Композиция также может быть использована при лечении злокачественного новообразования в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, терапией направленного действия и/или иммунотерапией. Упомянутая иммунотерапия может быть ингибированием иммунной контрольной точки.

Пациенты, которых подвергают лечению указанной композицией, могут быть недостаточно реагирующими и/или устойчивыми к химиотерапии, лучевой терапии, терапии направленного действия и/или иммунотерапии.

Фармацевтическая композиция по изобретению также может быть использована для лечения злокачественного новообразования в комбинации с одним или более цитотоксическими, цитостатическими или противоопухолевыми соединениями направленного действия.

Ее можно использовать при лечении злокачественного новообразования в комбинации с одним или более ингибиторами иммунной контрольной точки, где указанные ингибиторы иммунной контрольной точки могут быть выбраны из группы, включающей анти-PD-L1, анти-PD-1, анти-CTLA-4, анти-CD137, анти-LAG-3, анти-TIM-3, анти-OX40 и/или анти-GITR.

Композицию также можно использовать в комбинации с антителом, которое специфически связывается с человеческим PD-L1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CD137, OX40,

GITR и/или в комбинации с препаратом ниволумаб, пембролизумаб, урелумабом, утомилумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, тремелимуаб, ипилимуаб.

Он также может быть использован при лечении злокачественного новообразования при еженедельной или ежемесячной схеме дозирования.

Пациентам будет особенно понятно, что антитело и композиция в соответствии с изобретением проявляют любую дозоограничивающую токсичность или токсичность, обусловленную лечением, если она вообще имеет место, только в очень ограниченном объеме и, что важно, в меньшей степени, чем антитела и композиции предшествующего уровня техники.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к способам лечения, включающим введение эффективного количества антитела в соответствии с изобретением индивидуумам, которые в этом нуждаются. Такими индивидуумами могут быть пациенты, имеющие злокачественное новообразование. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способам лечения злокачественного новообразования, где злокачественное новообразование может быть солидной опухолью.

Стадия введения индивидууму, нуждающемуся в этом, может включать местное введение, например, местное введение в опухоль пациента (например, внутриопухолевое или перитуморальное).

Поскольку агенты на основе антител по изобретению являются подходящими для применения при лечении любого типа злокачественного новообразования, для которого активация CD40 может обеспечить терапевтическое преимущество, способы, включающие введение указанных антител, также подходят для лечения любого типа злокачественного новообразования, для которого активация CD40 может обеспечить терапевтическую пользу.

Например, злокачественное новообразование может быть выбрано из группы, состоящей из: рака предстательной железы; рака молочной железы; колоректального рака; рака поджелудочной железы; рака яичников; рака легких; рака шейки матки; рабдомиосаркомы; нейробластомы; множественной миеломы; лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, меланомы, рака мочевого пузыря и глиобластомы.

Кроме того, следует иметь в виду, что способы лечения в соответствии с изобретением могут включать в себя индивидуальное введение агентов на основе антител по изобретению пациенту или в качестве части комбинированного лечения (где дополнительное лечение может представлять собой фармацевтический цитотоксический или цитостатический агент, лучевую терапию, терапию направленного воздействия и/или хирургию).

Фактически, все признаки и благоприятные свойства антител по изобретению, как подробно описано выше, также отражены и включены в способы лечения и применения антител по изобретению.

Примеры

Следующие примеры используются вместе с фигурами и таблицами для

иллюстрации изобретения.

Пример 1: Связывание клетками антител против CD40

Чтобы определить эффективность гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA в связывании с клеточно-экспрессированными CD40, клетки НЕК-Blue-CD40L™ (InvivoGen) высевали в 25 мкл DMEM, содержащей 10% FBS, при плотности клеток 1000 клеток/на лунку в обработанный 384-луночный планшет с прозрачным дном для клеточных культур. Антитела добавляли до конечных концентраций в диапазоне от 1,25 мкг/мл до 0,01 нг/мл в 5 мкл среды. Через 24 часа клетки трижды промывали 25 мкл промывочного буфера (PBS, 0,05% Tween), а затем добавляли козье антитело против IgG человека, конъюгированное с Alexa-Fluor-488 (Jackson Laboratories), в концентрации 0,8 мкг/мл в 20 мкл среды. Через четыре часа добавляли 5 мкл красителя Hoechst в среде до конечной концентрации 5 мкг/мл. Сигналы связывания флуоресцентных клеток измеряли, используя автоматическое высокопроизводительное устройство для визуализации CellInsight (Thermo Fisher Scientific). Кривые подгонки и расчет EC50 получали с использованием Excel (Microsoft) и XLfit (IDBS). На Фигуре 1 приведены значения связывания EC50 в диапазоне от 3 до 49,5 нг/мл.

Пример 2: Индукция клеточной передачи сигналов NF-κB агонистическими антителами против CD40

Агонистическую активность гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA тестировали путем стимуляции клеток НЕК-Blue-CD40L™ (InvivoGen), которые несут индуцируемую NF-κB генную конструкцию с секретируемой эмбриональной фосфатазой (SEAP). 25000 клеток/на лунку в 20 мкл DMEM, содержащей 10% FBS, высевали в обработанный клеточной культурой 384-луночный планшет с прозрачным дном и культивировали в течение ночи. Затем антитела добавляли в объеме 5 мкл среды до конечных концентраций в диапазоне от 20 до 0,013 мкг/мл. После 6 часов инкубации при 37°C и 5% CO₂ 5 мкл надосадочной жидкости среды каждой лунки переносили в белый 384-луночный планшет с прозрачным дном, содержащий 20 мкл 2х реагента QUANTI-Blue™ (InvivoGen). После инкубации в течение одного часа при 37°C и 5% CO₂ измеряли оптическую плотность при длине волны 620, отражающую NF-κB-зависимую активацию секреции фосфатазы. Кривые подгонки и расчет EC50 получали с использованием Excel (Microsoft) и XLfit (IDBS). Значения EC50 на Фигуре 2 указывают на способность антител против CD40 индуцировать передачу сигналов NF-κB в клеточной линии НЕК-Blue-CD40L™.

Пример 3: Конкуренция за связывание с CD40L

Конкуренцию гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA за связывание CD40L с CD40 тестировали с использованием анализа ИФА. CD40L наносили на поверхность 384-луночного планшета Nunc™ MaxiSorp™ в объеме 25 мкл PBS и в концентрации 1 мкг/мл в течение одного часа при комнатной температуре. Антитела предварительно инкубировали в концентрации 5 мкг/мл с рекомбинантным

белком CD40 в концентрации 1,7 мкг/мл в общем объеме 40 мкл в течение 1,5 часов при комнатной температуре в буфере для ELISA (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween). Планшет Nunc™ MaxiSorp™ трижды промывали промывочным буфером (PBS, 0,1% Tween) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре с помощью PBS, 2% BSA, 0,05% Tween. После трех промывок в промывочном буфере 25 мкл комплекса антитело-CD40 добавляли в лунки планшета Nunc™ MaxiSorp™ и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После 3 промывок в промывочном буфере лунки инкубировали с 25 мкл разведения 1:2000 связанного с пероксидазой видоспецифичного козьего антитела против фрагмента F(ab)₂ человека (AbDSerotec) в буфере ИФА в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали шесть раз промывочным буфером и добавляли 30 мкл/лунку раствора субстрата ТМВ (Invitrogen). Через 10 минут при комнатной температуре в каждую лунку добавляли 30 мкл стоп-раствора (1 М HCl) и измеряли поглощение при длине волны 450 и 620 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов Tecan M1000. Сигнал ИФА для образцов, инкубированных с CP-870,893, указывает на отсутствие конкуренции с CD40L, в то время как гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA согласно изобретению конкурируют за связывание CD40L с CD40 (см. Фигуру 3).

Пример 4: CD40 связывающая активность против CD40 яванской макаки

Связывание гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA с белком CD40 яванской макаки было протестировано в биохимическом ИФА. Рекомбинантный белок супо-CD40 (Acro Biosystems) инкубировали в 384-луночном планшете Nunc™ MaxiSorp™ в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS в течение одного часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки буфером для промывки (PBS, 0,1% Tween) планшеты блокировали PBS, 2% BSA, 0,05% Tween в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты снова трижды промывали промывочным буфером, и антитела в концентрациях от 500 до 0,03 нг/мл в PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После 3 промывок в промывочном буфере лунки инкубировали с 12,5 мкл разведения 1:3000 связанного с пероксидазой видоспецифического козьего антитела против фрагмента F(ab)₂ человека (AbDSerotec) в буфере ИФА в течение одного часа при комнатной температуре. Лунки промывали шесть раз промывочным буфером и добавляли 15 мкл/на лунку раствора субстрата ТМВ (Invitrogen). Через 10 минут при комнатной температуре добавляли 15 мкл стоп-раствора (1 М HCl) на лунку и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 и 620 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов Tecan M1000. Кривые подгонки и расчет EC50 получали с использованием Excel (Microsoft) и XLfit (IDBS). Как показано на Фигуре 4, большинство антител связывается с супо-CD40 со значениями EC50 от 8 до 31,8 нг/мл.

Пример 5: Индукция созревания дендритных клеток

а. Полученные из моноцитов дендритные клетки были получены для проверки способности гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA

стимулировать созревание дендритных клеток, что измеряется секрецией цитокина IL12p40. Препараты лейкоцитарного слоя человека от разных доноров использовали для дифференциации дендритных клеток от моноцитов *in vitro*. Лейкоцитарный слой, полученный от Баварского Красного Креста, разбавляли 1:4 DPBS и наслаивали на градиенты плотности Ficoll-Paque (GE Healthcare). После центрифугирования межфазные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) трижды промывали DPBS, и моноциты выделяли с использованием магнитных гранул CD14 MicroBeads (MiltenyiBiotec) в соответствии с инструкциями производителя. Моноциты культивировали в RPMI-1640, содержащей 10% FCS, 1x Пен/Стреп, 1x L-глутамин, 50 нг/мл рекомбинантного человеческого GM-CSF (системы R & D) и 10 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-4 (R & D Systems) при плотности клеток $1,2 \times 10^6$ клеток/мл в колбах для культивирования клеток T-175. Каждые 48 часов 90% среды заменяли свежей, содержащей цитокины средой. На пятый день дифференцированные *in vitro* незрелые дендритные клетки (iDC) собирали и распределяли по 96-луночному планшету для клеточных культур при плотности клеток 10^6 клеток/мл в 100 мкл той же среды.

б. В одном эксперименте iDC стимулировали добавлением антитела против CD40 в концентрации 5 мкг/мл. Через 48 часов после стимуляции секретированный цитокин IL12p40 количественно определяли в надосадочной жидкости среды с использованием коммерчески доступного набора ИФА (R & D Systems) в соответствии с инструкциями производителя. На Фигуре 5 показано, что гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA стимулировали высвобождение IL12p40 дендритными клетками, происходящими из моноцитов, в различной степени, в диапазоне от менее чем 1 нг/мл до более чем 24 нг/мл, тогда как не связывающееся с CD40 контрольное антитело IgG1-LALA не приводит к стимуляции обнаруживаемых уровней IL12p40.

с. Гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA по изобретению не способны связываться с рецепторами Fc γ , которые экспрессируются на дендритных клетках, происходящих из моноцитов. Чтобы сравнить эти антитела с антителами, обладающими различной активностью связывания с Fc-рецептором, мы сконструировали эталонные антитела против CD40, CP-870,893, содержащие человеческие Fc-части IgG1, IgG1-LALA, IgG2 и IgG1-V11, и стимулировали полученные из моноцитов дендритные клетки различными концентрациями этих антител. Форма IgG1-V11 содержит четыре мутации (G237D, H268D, P271G, A330R) в Fc-части тяжелой цепи. Было описано, что эти мутации селективно увеличивают сродство к Fc γ -рецептору RIIb (Mimoto et al. 2013). На Фигуре 6 показано, что варианты CP-870,893 стимулируют высвобождение IL12p40 Fc-зависимым образом (IgG1-LALA < IgG2 < IgG1 < IgG1-V11). Поразительно, что стимуляция гуманизированными моноклональными антителами против CD40 IgG1-LALA по изобретению приводила к Fc-независимым уровням секреции IL12p40, которые покрывали и даже превышали диапазон, полученный с вариантами CP-870,893. Таким образом, антитела против CD40 по изобретению обеспечивают мощную

агонистическую активность в отношении первичных дендритных клеток, происходящих из моноцитов, без опосредованного Fc-рецептором сшивания белков CD40.

d. В другом эксперименте способность гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA индуцировать секрецию IL12p40 дендритными клетками, происходящими из моноцитов, определяли путем стимуляции концентрациями антител в диапазоне от 0,005 до 10 мкг/мл. На фигуре 7 показано, что значения EC50 для разных антител находились в диапазоне от 380 до 743 нг/мл.

Пример 6: Высвобождение TNF-альфа в анализе РВМС высокой плотности

Чтобы определить, индуцируют ли гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA общее высвобождение цитокинов в клетках крови, РВМС стимулировали антителами в соответствии с протоколом Römer et al. 2011. РВМС выделяли, как описано ранее, и культивировали в RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки АВ человека и 1х несущественные аминокислоты (NEAA) при плотности клеток 1×10^7 клеток/мл в колбе для культивирования клеток T175. Через два дня клетки собирали и высевали с плотностью 1×10^6 клеток/мл в трех экземплярах в 96-луночном планшете для культивирования клеток. Антитела добавляли в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали с РВМС в течение трех дней при 37 °С, 5% CO₂ и 95% влажности. В качестве положительного контроля в эксперименты было включено антитело ОКТ-3 (Abcam). Высвобождение TNF-альфа определяли количественно в надосадочной жидкости клеточной культуры с использованием коммерчески доступного набора ELISA для человеческого-TNF-альфа (R & D Systems) в соответствии с инструкциями производителя. На Фигуре 8 показано, что антитела против CD40 по изобретению и не связывающее CD40 контрольное антитело IgG1-LALA не стимулировали значительного высвобождения TNF-альфа РВМС, в отличие от антитела ОКТ-3.

Пример 7: Клеточный «пульс-чейз» анализ

Динамику связывания и интернализации клетками антител против CD40 анализировали с помощью «пульс-чейз» анализа с использованием клеток HEK-Blue-CD40L™ (InvivoGen). 2000 клеток/на лунку высевали в два черных 384-луночные планшета с прозрачным дном в среде DMEM, содержащей 10% FCS. После культивирования в течение ночи антитела против CD40 по изобретению и CP-870,893 Fc-вариантные антитела, как описано выше, добавляли в один планшет в концентрации 0,8 мкг/мл и инкубировали в течение 15 минут при 37°С и 5% CO₂. Затем оба планшета промывали три раза буфером для промывки клеток (PBS 0,05% Tween) и инкубировали в течение одного часа в культуральной среде. В течение последних 15 минут антитела добавляли в планшет 2 в концентрации 0,8 мкг/мл. Затем оба планшета трижды промывали буфером для промывки клеток, помещали на лед и инкубировали с 0,8 мкг/мл вторичного антитела против человеческих антител, связанного с Alexa-Fluor-488 (Jackson Laboratories), и 5 мкг/мл красителя Hoechst (Invitrogen) в течение 30 минут на льду. Флуоресцентные сигналы на клеточной поверхности определяли количественно с помощью высокопроизводительного устройства для визуализации CellInsight (Thermo

Fisher Scientific). На Фигуре 9 показано, что варианты антител к CP-870,893 сильно снижают сигналы на клеточной поверхности после часовой инкубации в условиях, допускающих интернализацию. Напротив, инкубация многих антител против CD40 по изобретению в тех же условиях приводит лишь к незначительному снижению сигналов на клеточной поверхности, что указывает на ограниченные скорости интернализации.

Пример 8: Корреляция индукции репортерного гена и активности созревания дендритных клеток гуманизированных антител против CD40

а. Анализы клеточного репортерного гена (HEK-Blue-CD40LTM) и созревания дендритных клеток (DC) проводили, как описано в примерах 2 и 5, соответственно. Антитела использовали в концентрации 5 мкг/мл для анализа DC и в концентрациях от 13 до 20000 нг/мл в анализе репортерного гена HEK-Blue-CD40LTM. Фигура 10 сравнивает максимальную индукцию, наблюдаемую в анализе репортерного гена, с высвобождением цитокинов IL12p40 с помощью DC после стимуляции 5 мкг/мл антител. Хотя все 88 гуманизированных антител против CD40 IgG1-LALA индуцируют экспрессию репортерного гена в одинаковой степени, некоторые антитела демонстрируют очень высокую стимуляцию высвобождения IL12p40 с помощью DC. Клетки HEK-Blue-CD40LTM не экспрессируют Fcγ-рецепторы. Анализ охватывает основные агонистические активности антител против CD40 независимо от связывания с Fcγ-рецептором. DC экспрессируют Fcγ-рецепторы, и агонистическая активность антител против CD40, таких как CP-870,893, зависит от связывания с Fcγ-рецептором (Пример 5). Тем не менее, хотя у большинства из 88 антител IgG1-LALA отсутствует сильная активация DC, небольшая фракция может индуцировать очень сильную активацию DC без перекрестного связывания, опосредованного Fcγ-рецептором. Следовательно, высокоагонистическое антитело против CD40, чья активность на первичных дендритных клетках не зависит от перекрестного связывания Fcγ-рецептора, является редким случаем, и для идентификации требуется скрининг большого количества антител-кандидатов с основными агонистическими активностями.

Пример 9: Стимуляция костимулирующих рецепторов и высвобождение цитокинов на дендритных клетках с помощью агонистических антител против CD40

а. Для тестирования активности гуманизированных агонистических антител против CD40 IgG1-LALA в стимуляции экспрессии костимулирующего рецептора и высвобождения воспалительных цитокинов клетками DC, незрелые DC, полученные из моноцитов (iDC), были получены от трех независимых доноров, как описано в Примерах 5. iDC обрабатывали антителами в концентрации 2 мкг/мл или CD40L (R & D Systems 6245-CL-050) при 20 мкг/мл в течение 48 часов. Стимулированные зрелые DC собирали, окрашивали с использованием меченных флуорофором антител против HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD54 и CD95 (все от Miltenyi Biotec) и анализировали проточной цитометрией на устройстве BD FACSVerser. На Фигуре 11 показана стимуляция экспрессии рецептора в виде кратности индукции по сравнению с обработкой контролем изотипа антитела. Данные демонстрируют сильную индукцию костимулирующих

рецепторов, в частности CD86. CP-870,893 показывает общую более низкую активность по сравнению с антителами MAB-16-0262, MAB-16-0451, MAB-16-0464 и MAB-16-0406 по изобретению. Дальнейшее снижение активности наблюдается при использовании варианта CP-870,893, содержащего константную часть IgG1-LALA, что подтверждает зависимость этого антитела от связывания Fc γ -рецептора.

б. На Фигуре 12 показаны результаты измерений цитокинов в надосадочных жидкостях культур DC с использованием набора BD «human inflammatory cytometric bead array» для определения воспалительных цитокинов (BD# 551811) в соответствии с инструкциями производителя. Антитела MAB-16-0262, MAB-16-0451, MAB-16-0464 и MAB-16-0406 по изобретению показывают очень высокие уровни высвобождения IL-12p40 и IL-12p70, тогда как другие цитокины, например, TNF- α , IL-1 β , IL-10 и IL-6 продуцируются и секретируются в гораздо меньшей степени. Высвобождение IL-12p40 и IL-12p70 DC, обработанных вариантами CP-870,893 IgG2 и IgG1, значительно ниже по сравнению с высвобождением, наблюдаемым с антителами по изобретению. В аналогичных экспериментах *in vitro* дифференцированные iDC от трех независимых доноров обрабатывали агонистическими антителами против CD40 в течение 48 часов в концентрациях от 10000 до 5 нг/мл. Экспрессию рецептора и высвобождение цитокинов анализировали, как описано выше. Кривые подгонки и расчет EC50 были получены с использованием Excel (Microsoft) и XLfit (IDBS). Данные, представленные на Фигурах 13 и 14, иллюстрируют дозозависимые эффекты, наблюдаемые для одного донора. Результаты двух других доноров показали качественно аналогичные эффекты. Таким образом, эффективность гуманизированных антител против CD40 по изобретению, определяемая по значениям EC50, аналогична активности CP-870,893, в то время как максимальный индуцированный эффект, в частности, на высвобождение цитокинов IL-12 и экспрессию корецепторов, значительно выше, чем от CP-870,893.

Пример 10: Стимуляция костимулирующих рецепторов на В-клетках агонистическими антителами против CD40

а. Стимуляция костимулирующих рецепторов гуманизированными антителами против CD40 IgG1-LALA была также протестирована на В-клетках. PBMC от трех разных доноров выделяли из лейкоцитарного слоя человека центрифугированием в градиенте плотности Фикола, и свежие В-клетки очищали путем отрицательного магнитного обогащения с использованием набора для выделения В-клеток II (Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. 2×10^5 В-клеток в 100 мкл RPMI-1640+10% сыворотки АВ человека стимулировали концентрацией антител в диапазоне от 500 до 0,2 нг/мл в течение 48 часов. Стимулированные В-клетки собирали, окрашивали с использованием меченных флуорофором антител против HLA-DR, CD86 и CD80 (все от Miltenyi Biotec) и анализировали проточной цитометрией на устройстве BD FACSVersе. На Фигуре 15 показана дозозависимая стимуляция экспрессии рецептора в В-клетках одного донора в виде кратности индукции по сравнению с обработкой контролем изотипа антитела. Кривые подгонки и расчет EC50 были получены с использованием Excel

(Microsoft) и XLfit (IDBS). Результаты показывают, что антитела по изобретению также стимулируют костимулирующие рецепторы на В-клетках, однако уровень положительной регуляции ниже, чем у DC.

Пример 11: Конкуренция CD40L со связыванием антитела против CD40 с CD40 на клетках

а. Связывание антител против CD40 по изобретению с клетками HEK-Blue-CD40L™ в присутствии CD40L тестировали, чтобы проверить, связываются ли антитела с сайтом связывания CD40L с CD40 клеточной поверхности. Клетки HEK-Blue-CD40L™ предварительно инкубировали с антителами при их концентрации связывания EC90 в течение 30 минут при 40°C. CD40L, содержащий Fc-меченый мышинный IgG2a (AB Biosciences), добавляли в концентрации от 10000 до 9,8 нг/мл, и клетки инкубировали в течение 60 минут при 4 °C. Антитела против CD40 и CD40L, связанный с экспрессируемым в клетках CD40, детектировали с использованием вторичного конъюгированного с DyLight 405 антитела против мышинного IgG и конъюгированного с Alexa Fluor 488 антитела против человеческого IgG (Jackson Laboratories) и анализировали с использованием прибора FACSVerse (BD). На Фигуре 16А показано стабильное связывание концентраций антитела против CD40, за исключением CP-870,893, сигнал связывания антител которого слегка снижается при более высоких концентрациях CD40L. CD40L связывается с клетками дозозависимым образом, а CP-870,893 не оказывает существенного влияния на связывание CD40L (Фигура 16В). Напротив, антитела по изобретению сильно предотвращают связывание CD40L с экспрессируемой клеткой CD40, указывая на то, что эти антитела связываются с сайтом связывания CD40 для CD40L и блокируют связывание CD40L с CD40 (Фигура 16В).

Пример 12: Индукция экспрессии рецептора смерти FasR (CD95) агонистическими антителами против CD40 в комбинации с CD40L

а. Чтобы протестировать влияние CD40L на опосредованное антителами против CD40 воздействие на клетки, клетки Ramos обрабатывали только CD40L или в комбинации с агонистическими антителами против CD40. Клетки Ramos высевали в 96-луночные планшеты в RPMI, содержащей 10% FCS, при плотности клеток $1,25 \times 10^6$ клеток/мл. Антитела добавляли в лунки в концентрации 10 мкг/мл, и планшет инкубировали в течение 10 минут при 37 °C, 5% CO₂, 95% влажности. Затем в некоторые лунки добавляли CD40L (R & D Systems) до конечной концентрации 10 мкг/мл, и планшет инкубировали в течение ночи при 37 °C, 5% CO₂, 95% влажности. Клетки промывали DPBS и окрашивали FITC-меченным антителом против CD95 (Miltenyi Biotec). На Фигуре 17 показано, что индукция CD95 с помощью CP-870,893 сильно увеличивается при добавлении CD40L, в то время как совместная обработка всех протестированных антител против CD40 по изобретению снижает эффект CD40L. Данные указывают на то, что агонистические антитела против CD40 по изобретению, которые связывают CD40L, связывающийся с CD40, предотвращают синергетические и аддитивные эффекты CD40L и, следовательно, допускают контролируемую и безопасную фармакологию.

Пример 13: Аффинности гуманизированных агонистических антител против CD40 IgG1-LALA

а. Биохимические аффинности антител по изобретению определяли измерениями поверхностного плазмонного резонанса. Антитела обратимо иммобилизуют на поверхности сенсорного чипа CM5 с помощью антитела против человеческого Fc. Кинетику взаимодействия иммобилизованных антител с растворимым мономерным белком CD40 человека или яванской макаки (Acro Biosystems) анализировали на приборе Biacore T200 SPR. Кинетические данные были определены с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1. На Фигуре 18 показано, что антитела MAB-16-0451 и MAB-16-0464 имеют KD 1,2 и 2,6, тогда как MAB-16-0262 и CP-870,893 показывают значения KD 15,7 или 8,9, соответственно. Значения KD, полученные с использованием белка CD40 яванской макаки, демонстрируют сходную аффинность.

Пример 14: Конкурентное связывание антител против CD40 с CD40

а. Чтобы протестировать, связываются ли гуманизированные агонистические антитела против CD40 по изобретению с перекрывающимися участками молекулы CD40, проводили ИФА с конкурентным связыванием. Антитела наносили в виде покрытия на 384-луночные планшеты Maxisorp в концентрации 625 нг/мл в PBS в течение 60 минут с последующей стадией блокирования PBS, 2% BSA, 0,05% Tween в течение 70 минут. Все антитела инкубировали отдельно в концентрации 10 мкг/мл в пробирках вместе с 330 нг/мл HIS-меченного рекомбинантного белка CD40 (Acro Biosystems) и 4 мкг/мл связанного с пероксидазой детектирующего анти-HIS- антитела (Sigma-Aldrich) в течение 60 минут в буфере для ИФА (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween). Планшет трижды промывали PBS, 0,1% Tween, перед тем как смеси антитело/HIS-CD40/анти-HIS-пероксидаза добавляли в лунки планшета. Планшет инкубировали в течение 60 минут. Лунки промывали шесть раз PBS, добавляли 0,1% Tween и 15 мкл/лунку раствора субстрата TMB (Invitrogen). Реакцию останавливали с помощью 15 мкл/лунку стоп-раствора (1 M HCl) и измеряли поглощение при длине волны 450 и 620 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов Tecan M1000. Фигура 19 демонстрирует, что антитела по изобретению не конкурируют с CP-870,893 за связывание с CD40. Однако каждое антитело конкурирует с любым другим антителом по изобретению, что демонстрирует, что эти антитела связываются с той же областью на CD40. Важно, что поскольку агонистическая активность антител по изобретению охватывает широкий диапазон (Примеры 9 и 10), это показывает, что паратопы агонистических антител против CD40 в первую очередь определяют агонистическую активность антител против CD40.

Пример 15: Опосредованная антителами эффекторная функция антител против CD40 IgG1-LALA

а. Чтобы проверить эффективность мутации LALA в константной части антитела IgG1 в отношении снижения опосредованной антителами эффекторной функции, например, ADCC, анализ на основе линии эффекторных репортерных клеток Jurkat (Promega ADCC Bioassay, # G701A), применялся в соответствии с инструкцией

производителя и с использованием клеток HEK-Blue-CD40L™ в качестве клеточных мишеней. 5000 клеток HEK-Blue-CD40L™ на лунку высевали в 384-луночный аналитический планшет с плоским дном в 25 мкл DMEM+10% FCS и инкубировали 20 ч при 37°C, 5% CO₂. Среду заменяли 8 мкл среды RPMI, содержащей 4% FCS с низким содержанием IgG, перед тем, как добавляли 4000 эффекторных клеток на лунку в 8 мкл той же среды. Наконец, добавляли антитела против CD40, CP-870,893, содержащие либо Fc-часть IgG1, либо IgG1-LALA, в 8 мкл среды в концентрациях от 10000 до 0,002 нг/мл. Планшет инкубировали в течение 6 ч при 37 °C, 5% CO₂. Активность люциферазы эффекторных клеток измеряли с использованием реагентов для анализа BioGlo Luciferase (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Люминесценцию считывали с использованием считывающего устройства для микропланшетов Tecan M1000. Кратность индукции рассчитывали по формуле RLU (обработка антителом - фон)/RLU (носитель - фон). Кривые подгонки были получены с использованием Excel (Microsoft) и XLfit (IDBS). Фигура 20 демонстрирует, что мутация LALA в IgG1 аннулирует опосредованную Fc-рецептором передачу сигналов в эффекторных клетках.

Пример 16: Безопасность терапии агонистическими антителами против CD40 на гуманизированной мышинной модели

а. Для оценки безопасности использовали гуманизованную мышиную модель со стволовыми клетками. У мышей Nod/Scid/gamma (c) (null) у FcRg ^{-/-} отсутствуют мышинные активирующие Fc-рецепторы. Следовательно, связывание Fc-рецептора терапевтических антител иммунными клетками человека не нарушается связыванием мышинового Fc-рецептора в этой модели. Мышей облучали сублетально 1,4Гр в течение первых 24 часов после рождения. Через 4-6 часов мышам трансплантировали i.v. 20000-50000 человеческих гемопоэтических стволовых клеток, выделенных из пуповинной крови. Через 12 недель после трансплантации наличие иммунных клеток человека было подтверждено проточной цитометрией клеток периферической крови. Успешно гуманизированным мышам однократно вводили i.v. 3 мкг/г CP-870,893, MAB-16-0451 или антитела контроля изотипа. Массу тела и температуру измеряли до обработки и в разные моменты времени после введения антитела (Фигура 21). Данные показывают значительное снижение температуры тела у 3 из 6 мышей, получавших CP-870 893, и эти мыши должны были быть умерщвлены из-за серьезного ухудшения состояния организма. Напротив, мыши, получавшие MAB-16-0451, не демонстрировали значительного влияния на температуру тела, а также не было каких-либо других явных признаков нарушения состояния организма. Это указывает на то, что высокоагонистические антитела против CD40-IgG1-LALA, лишенные активности связывания с Fc-рецептором, могут применяться терапевтически без явных признаков токсичности, тогда как токсические эффекты менее активного агонистического антитела CP-870,893-IgG2 могут быть продемонстрированы *in vivo* на этой модели.

Подписи к чертежам

Фиг. 1: Связывание клеток

Моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA тестировали на связывание с клеточно-экспрессируемым антигеном CD40 на клетках HEK-Blue-CD40L™ (InvivoGen). Значения EC50 демонстрируют сильное связывание тестируемых антител.

Фиг. 2: Определение EC50 HEK-Blue в 8-точечном анализе

Агонистическую активность гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA тестировали в анализе репортерного гена NF-κB на клеточной основе. Клетки HEK-Blue-CD40L™ (InvivoGen) инкубировали в течение 24 часов с различными концентрациями антител. Значения EC50 демонстрируют способность антител индуцировать передачу сигналов NF-κB.

Фиг. 3: Конкуренция эпитопов CD40-лиганд

Чтобы протестировать, связываются ли гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA с эпитопом, перекрывающимся с сайтом связывания CD40L, проводили конкурентный ИФА для CD40L. Различные концентрации антител против CD40 предварительно инкубировали с рекомбинантным белком CD40 для образования связывающего комплекса. Затем комплекс добавляли в микропланшеты, покрытые рекомбинантным CD40L. После промывки связанные комплексы CD40-анти-CD40 детектировали с использованием антитела против человеческого F(ab)₂, связанного с пероксидазой. Сигналы ИФА для эталонного антитела CP-870,893 указывают на отсутствие конкуренции с CD40L и, следовательно, связывание с эпитопом, отличным от сайта связывания CD40L. Данные показывают, что протестированные гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA связываются с эпитопом, перекрывающимся с сайтом связывания CD40L.

Фиг. 4: Активность связывания CD40 яванской макаки

Активность связывания гуманизированных моноклональных антител IgG1-LALA против CD40 с белком яванской макаки (*Macaca fascicularis*) тестировали в ИФА с использованием рекомбинантного белка CD40 яванской макаки (Acro Biosystems). Значения EC50 указывают на сильное связывание антител. н. д. = не детектируется в тестируемом диапазоне концентраций

Фиг. 5 а) б): Индукция созревания дендритных клеток

Для проверки агонистической активности моноклональных антител IgG1-LALA против CD40 на первичных клетках-мишенях анализировали созревание полученных из моноцитов незрелых дендритных клеток. Незрелые дендритные клетки, которые дифференцировались *in vitro* от моноцитов, инкубировали в течение 48 часов с агонистическими антителами против CD40 в концентрации 5 мкг/мл. Полученный из дендритных клеток секретированный IL12p40 был впоследствии количественно определен в супернатанте среды с помощью биохимического ИФА.

Фиг. 6: Созревание дендритных клеток

Активность гуманизированных моноклональных анти-CD40 антител IgG1-LALA при стимуляции секреции IL12p40 дендритными клетками определяли при различной

концентрации антител, и эту активность сравнивали с антителами CP-870,893, несущими разные Fc-части (IgG1, IgG1-LALA, IgG2 и IgG1 -V11). Антитела инкубировали в течение 48 часов с *in vitro* дифференцированными незрелыми дендритными клетками. Высвобождение IL12p40 измеряли с помощью ИФА.

Фиг. 7: Определение EC50 антител против CD40 при созревании дендритных клеток

Значения EC50 гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA в секрети IL12p40, опосредованной дендритными клетками, определяли путем тестирования концентраций антител в диапазоне от 10 до 0,005 мкг/мл. Антитела инкубировали в течение 48 часов с *in vitro* дифференцированными незрелыми дендритными клетками. Высвобождение IL12p40 измеряли с помощью ELISA.

Фиг. 8: Анализ высвобождения цитокинов

Гуманизированные моноклональные антитела против CD40 IgG1-LALA тестировали в анализе высвобождения цитокинов РВМС высокой плотности при 10 мкг/мл для определения общей индукции воспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа. Данные показывают, что в отличие от антитела против CD3 (ОКТ3) антитела против CD40 не вызывают значительной секреции TNF-альфа.

Фиг. 9: Клеточный «пульс-чейз» анализ с антителами

Динамику и интернализацию связывания антител проверяли в клеточном «пульс-чейз» анализе. Антитела инкубировали с клеточными культурами НЕК-Blue-CD40L™ в течение 15 мин в концентрации 0,8 мкг/мл. После отмывки антителам давали возможность интернализироваться в течение 60 минут, после чего клетки снова промывали и оставленное локализованное на клеточной поверхности антитело против CD0 детектировали вторичным антителом, меченным Alexa-488. В условиях, не позволяющих интернализацию, клетки обрабатывали аналогичным образом, но антитела инкубировали только в течение 15 минут с последующей промывкой и вторичной инкубацией антител. Данные показывают, что в условиях, допускающих интернализацию, сигналы от локализованных на поверхности антител снижаются в разной степени для протестированных гуманизированных моноклональных антител против CD40 IgG1-LALA. Сильное снижение сигнала наблюдается для всех изоформ антитела CP-870,893.

Фиг.10: Корреляция индукции репортерного гена и активности созревания дендритных клеток гуманизированных антител против CD40

88 гуманизированных антител против CD40 IgG1-LALA были протестированы на их активность в анализе репортерного гена НЕК-Blue и анализе созревания дендритных клеток. Репортерную активность гена НЕК-Blue количественно определяли с помощью OD 655, что коррелирует с индуцированной секрецией SEAP, созревание дендритных клеток определяют с помощью высвобождения IL12p40 (ИФА).

Фиг.11: Стимуляция костимулирующих рецепторов на дендритных клетках с помощью агонистических антител против CD40

In vitro дифференцированные незрелые iDC стимулировали агонистическими

антителами против CD40, антителами контроля изотипа или CD40L в течение 48 часов. Экспрессию молекул костимулирующего рецептора измеряли проточной цитометрией. Средние интенсивности флуоресценции были нормализованы к обработкам контролем изотипа или, в случае CD40L, к необработанным образцам. Индукция экспрессии выражается в виде кратности индукции (FOI) по сравнению с контрольной обработкой.

Фиг.12: Высвобождение цитокинов дендритными клетками, обработанными антителом против CD40

In vitro дифференцированные незрелые iDC стимулировали агонистическими антителами против CD40, антителами контроля изотипа или CD40L в течение 48 часов. Высвобождение цитокинов измеряли с помощью ИФА (IL-12p40) или с помощью проточной цитометрии, используя набор BD «cytometric bead array».

Фиг.13: Дозозависимая стимуляция костимулирующих рецепторов на дендритных клетках агонистическими антителами против CD40

In vitro дифференцированные незрелые iDC стимулировали агонистическими антителами против CD40 или антителами контроля изотипа, в течение 48 часов в концентрациях в диапазоне от 10000 до 5 нг/мл. Экспрессию молекул костимулирующего рецептора измеряли проточной цитометрией. Средние интенсивности флуоресценции были нормализованы к обработкам контролем изотипа. Индукция экспрессии выражается в виде кратности индукции (FOI) по сравнению с контрольной обработкой. Расчетные значения EC50 представлены в таблице.

Фиг.14: Зависимое высвобождение цитокинов дендритными клетками, обработанными антителом против CD40

In vitro дифференцированные незрелые iDC стимулировали агонистическими антителами против CD40 и антителами контроля изотипа в течение 48 часов. Высвобождение цитокинов измеряли проточной цитометрией с использованием набора BD «cytometric bead array».

Фиг.15: Дозозависимая стимуляция костимулирующих рецепторов на В-клетках агонистическими антителами против CD40

В-клетки стимулировали агонистическими CD40 антителами или антителами контроля изотипа в течение 48 часов в концентрациях в диапазоне от 500 до 0,2 нг/мл. Экспрессию молекул костимулирующего рецептора измеряли проточной цитометрией. Средние интенсивности флуоресценции были нормализованы к изотипическим контрольным обработкам. Индукция экспрессии выражается в виде кратности индукции (FOI) по сравнению с контрольной обработкой. Расчетные значения EC50 представлены в таблице.

Фиг.16: Конкуренция антител против CD40 с CD40L за связывание с клеточно-экспрессированным CD40

Клетки HEK-Blue-CD40L™ предварительно инкубировали с антителами против CD40-IgG1-LALA в концентрациях EC90 перед добавлением CD40L в концентрациях от 10000 до 9,8 нг/мл. Связывание антител против CD40 и связывание CD40L с CD40,

экспрессируемым на поверхности клетки, определяли с использованием различных вторичных антител, связанных с флуорофором.

Фиг.17: Индукция экспрессии рецептора смерти FasR (CD95) агонистическими антителами против CD40 в комбинации с CD40L

Клетки Ramos В-лимфомы стимулировали в течение ночи одним CD40L или в комбинации с агонистическими антителами против CD40 или антителами контроля изотипа. Экспрессию CD95 определяли количественно с помощью проточной цитометрии. Положительная регуляция экспрессии выражается как кратность индукции (FOI) по сравнению с контрольной обработкой.

Фиг.18: Аффинности гуманизированных агонистических антител против CD40 IgG1-LALA

Биохимические аффинности измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 SPR. Кинетические данные были определены с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1.

Фиг.19: Конкуренция антител за связывание CD40

Связывание предварительно инкубированной смеси HIS-меченого белка CD40 и различных антител против CD40 с планшетами, покрытыми различными антителами против CD40. Последовательное связывание обоих антител против CD40 выявляют POD-мечеными анти-HIS-антителами.

Фиг.20: Антитело-опосредованная эффекторная функция антител против CD40 IgG1-LALA

Эффекторную функцию, опосредованную антителами против CD40, анализировали, используя линию эффекторных клеток Jurkat с репортерным геном люциферазы и HEK-Blue-CD40L™ в качестве клеток-мишеней. Антитела IgG1-LALA или IgG1 против CD40 инкубировали в дозах от 10000 до 0,002 нг/мл с клетками-мишенями и эффекторами в течение 6 часов. Кратность индукции измеренной активности люциферазы указывает на опосредованную антителом против CD40 активацию эффекторных клеток.

Фиг.21: Безопасность терапии агонистическими антителами против CD40 на гуманизированной мышинной модели

Мышам Nod/Scid/gamma (c) (null) FcRg -/- инъецировали 3 мкг/г MAB-16-0451 или CP-870,893 антител против CD40 в день 0. Температуру измеряли до введения и в разные моменты времени после введения. Три мыши, получавшие CP-870,893, которые продемонстрировали поразительное снижение температуры тела, должны были быть умерщвлены через 3 дня.

Фиг.22: Последовательности (аминокислоты в однобуквенном коде)

Полные последовательности переменных областей (VR):

Тяжелая цепь: VH полная: SEQ ID NO: 1-14

Легкая цепь: VL полная: SEQ ID NO: 15-28

Области, определяющие комплементарность, (CDR):

Тяжелая цепь:

CDR-H1: SEQ ID NO: 29-42

CDR-H2: SEQ ID NO: 43-56

CDR-H3: SEQ ID NO: 57-70

Легкая цепь:

CDR-L1: SEQ ID NO: 71-84

CDR-L2: SEQ ID NO: 85-98

CDR-L3: SEQ ID NO: 99-112

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агонистическое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с рецептором CD40 человека и способно индуцировать передачу сигнала CD40 независимо от Fc γ -опосредованного перекрестного связывания рецептора CD40.

2. Антитело по п.1, где антитело представляет собой гуманизированное антитело IgG1LALA.

3. Антитело по п.2, где антитело содержит по меньшей мере аминокислотные замены в L234A и L235A Fc-области IgG1 человека или S228P и L235E Fc-области IgG4 человека.

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело связывается с эпитопом, который перекрывается с сайтом связывания CD40L.

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело активирует APC человека.

6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело активирует клетки, выбранные из группы, содержащей дендритные клетки (DC), В-клетки, моноциты, миелоидные клетки и опухолевые клетки.

7. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антитело обладает косвенным, опосредованным иммунными клетками цитотоксическим эффектом в отношении опухолевых клеток.

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое имеет по меньшей мере одну из дополнительных характеристик

(a) не связываются с рецептором Fc γ ;

(b) обладает аффинностью связывания клеток с CD40 со значением EC50, равным или менее чем 49,5 нг/мл;

(c) имеет значения KD, равные или менее чем 15,7 нМ;

(d) является перекрестно реактивным с CD40 яванской макаки со значением KD, равным или менее чем 10,3 нМ;

(e) ингибирует CD40L путем связывания с CD40;

(f) предотвращает синергетические и аддитивные эффекты CD40L-опосредованных функций;

(g) индуцирует созревание антигенпрезентирующих клеток, как определено высвобождением IL12p70 со значением EC50, равным или менее чем 208 нг/мл.

и/или как определено по индукции CD86 на дендритных клетках, по меньшей мере, в 7,5 раз и с EC50 равным или менее чем 148 нг/мл; и/или

(h) снижает уровень CD40 на поверхности клетки менее чем на 50%.

9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит

а) область VH, выбранную из группы областей VH, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1H SEQ ID NO: 29+n, области CDR2H SEQ ID NO: 43+n и области CDR3H SEQ ID NO: 57+n, где n представляет собой число,

выбранное из группы, состоящей из 0-13, и

b) область VL, выбранную из группы областей VL, содержащих области CDR, выбранные из группы, состоящей из области CDR1L SEQ ID NO: 71+m, области CDR2L SEQ ID NO: 85+m и области CDR3L SEQ ID NO: 99+m, где m представляет собой число, выбранное из группы, состоящей из 0-13,

где CDR могут содержать любую одну или более аминокислотных мутаций, которые не снижают их активность в соответствии с изобретением.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), по меньшей мере, на 85% идентичную области VH, выбранной из группы, состоящей из областей VH SEQ ID NO: 1-14.

11. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит вариабельную область легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 85% идентична области VL, выбранной из группы, состоящей из областей VL SEQ ID NO: 15-28.

12. Антитело по любому из пп.1-11 для применения для лечения пациентов, страдающих онкологическим заболеванием.

13. Антитело по п.12, где онкологическое заболевание представляет собой солидную опухоль.

14. Антитело по п.12 или 13, в котором онкологическое заболевание выбрано из группы, включающей рак поджелудочной железы, рак легкого, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожная или внутриглазная меланома, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак почки, лимфому Ходжкина, рак печени, рак желчного пузыря, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак слюнной железы или рак матки.

15. Антитело по любому из пп.-14, где антитело используют при лечении онкологического заболевания в сочетании с цитотоксическими или цитостатическими агентами, лучевой терапией, терапией направленного действия, иммунотерапией или хирургией.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела по любому из предыдущих пунктов.

По доверенности

ФИГ.1

Антитело	EC50 клеточного связывания [нг/мл]
MAV-16-0262	6,3
MAV-16-0346	49,5
MAV-16-0451	8,9
MAV-16-0489	3,2
MAV-16-0484	21,9
MAV-16-0464	3,0
MAV-16-0267	3,4
MAV-16-0406	6,6
MAV-16-0400	5,8
CP-870-IgG1-LALA	14,5

ФИГ.2

Антитело	HEK-Blue™ EC50 [нг/мл]
MAV-16-0262	1957
MAV-16-0346	6243
MAV-16-0406	1235
MAV-16-0400	2168
MAV-16-0451	2267
MAV-16-0489	1127
MAV-16-0464	1437
MAV-16-0267	2333
MAV-16-0283	1445
MAV-16-0325	2211
MAV-16-0377	900
MAV-16-0386	1386
MAV-16-0388	576

ФИГ.3

Антитело	OD при 450 нм
MAV-16-0262	0,11
MAV-16-0346	0,09
MAV-16-0451	0,13
MAV-16-0489	0,01
MAV-16-0484	0,07
MAV-16-0464	0,09
MAV-16-0267	0,10
MAV-16-0406	0,07
MAV-16-0400	0,08
CP-870-IgG1-LALA	2,54

ФИГ.4

Антитело	Супо-CD40 ИФА EC50 [нг/мл]
MAV-16-0262	11,9
MAV-16-0346	8,2
MAV-16-0451	10,4
MAV-16-0484	31,8
MAV-16-0464	8
MAV-16-0267	7
MAV-16-0406	11,1
CP-870,893	8

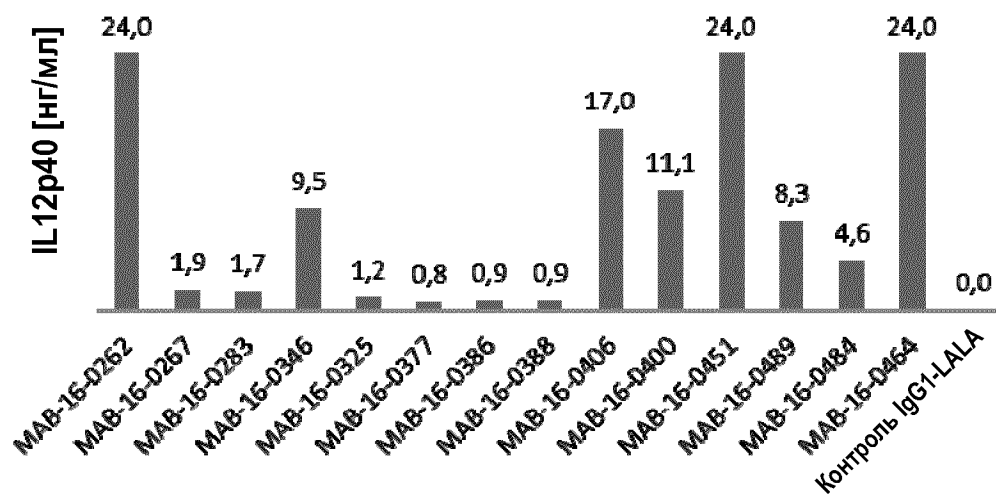
ФИГ.5

а)

Антитело	IL12p40 [нг/мл]
MAV-16-0262	>24,0
MAV-16-0267	1,9
MAV-16-0283	1,7
MAV-16-0346	9,5
MAV-16-0325	1,2
MAV-16-0377	0,8
MAV-16-0386	0,9
MAV-16-0388	0,9
MAV-16-0406	17,0
MAV-16-0400	11,1
MAV-16-0451	>24,0
MAV-16-0489	8,3
MAV-16-0484	4,6
MAV-16-0464	>24,0
IgG1-LALA контроль	0

б)

Высвобождение IL12p40 дендритные клетками



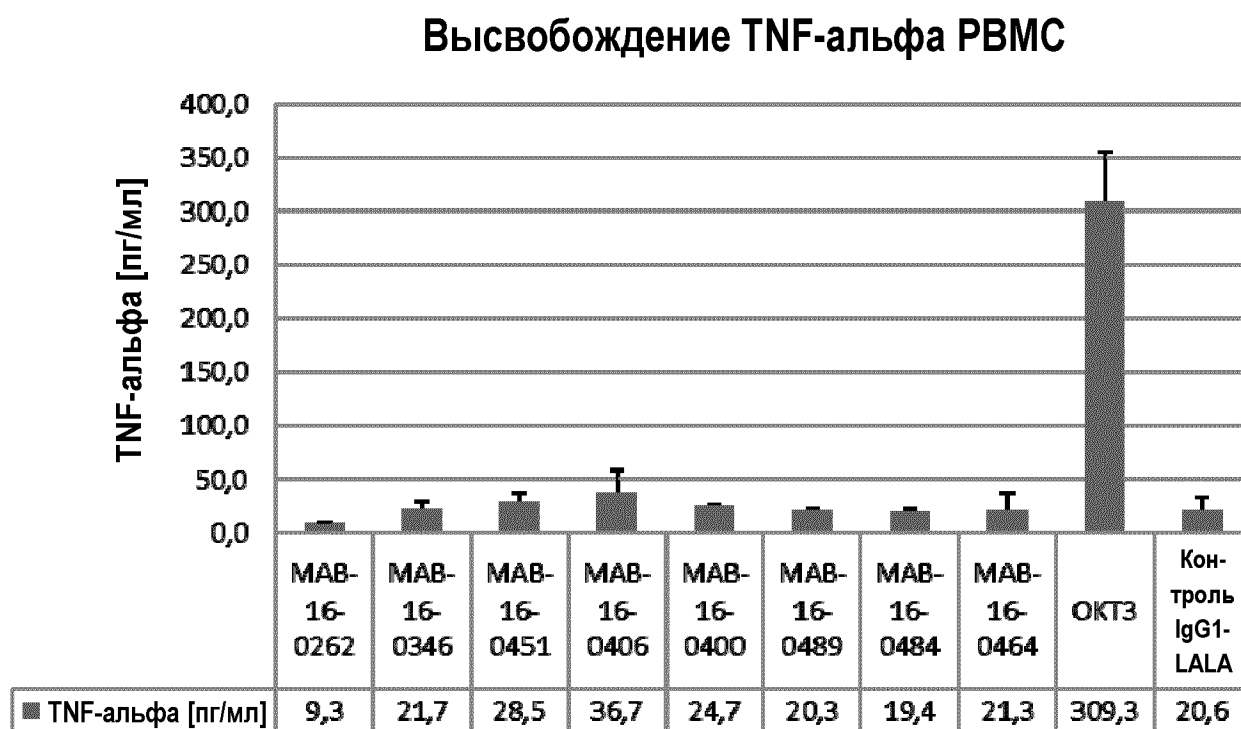
ФИГ.6

	IL-12p40, секретированный дендритными клетками, обработанными антителом против CD40 [нг/мл]			
Антитело	5 мкг/мл антитела	1,7 мкг/мл антитела	0,6 мкг/мл антитела	0,2 мкг/мл антитела
MAV-16-0262	55,2	81,5	81,8	35,8
MAV-16-0451	81,7	207,7	164,0	57,9
MAV-16-0489	13,4	17,7	10,3	2,8
MAV-16-0484	6,8	7,8	3,5	0
MAV-16-0267	2,5	2,6	2,1	0
MAV-16-0406	19,4	34,7	24,7	11,8
CP870-IgG1-LALA	1,6	2,1	1,2	0,7
CP870-IgG1-V11	76,1	72,2	77,5	26,1
CP870-IgG2	5,7	5,8	0	0
CP870-IgG1	32,0	31,5	0	0
Контроль IgG1-LALA	0	0	0	0

ФИГ.7

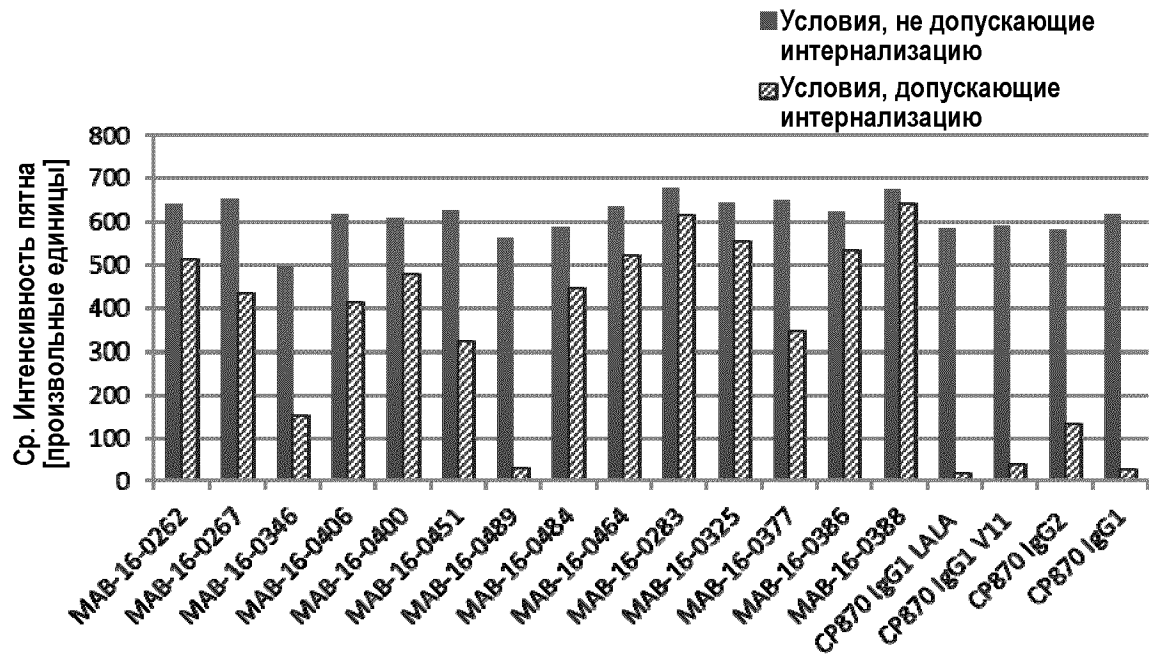
Антитело	EC50 высвобождения IL12p40 [нг/мл]
MAV-16-0262	416
MAV-16-0406	380
MAV-16-0400	392
MAV-16-0451	659
MAV-16-0489	743
MAV-16-0484	388

ФИГ.8

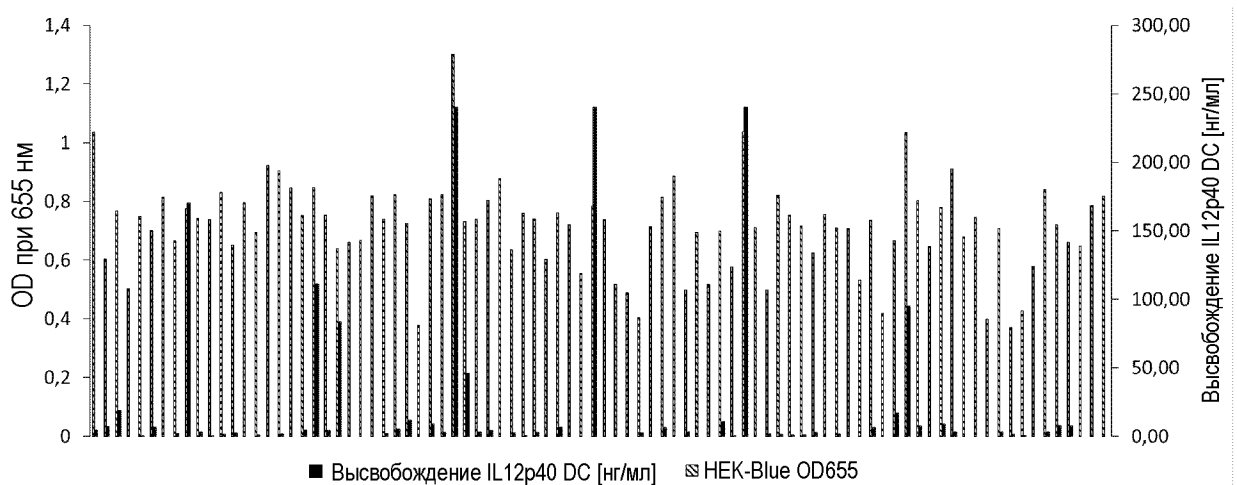


ФИГ.9

Клеточный анализ «пульс-чейз» антитела



ФИГ.10



ФИГ.11

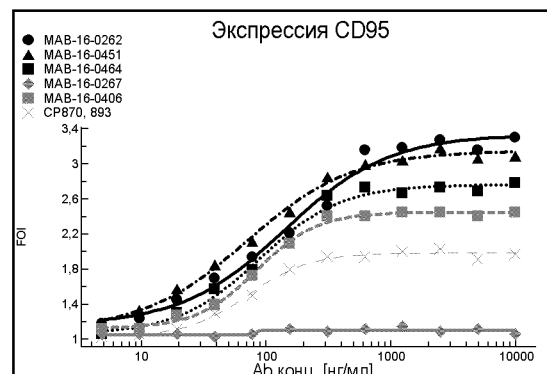
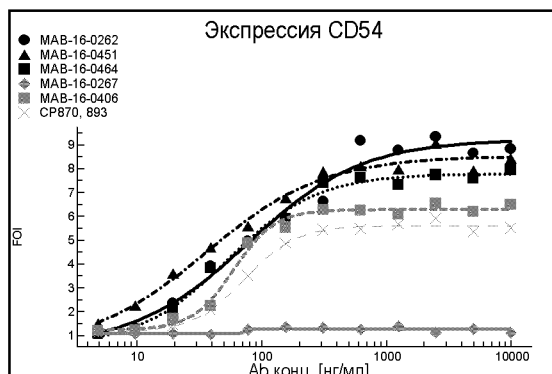
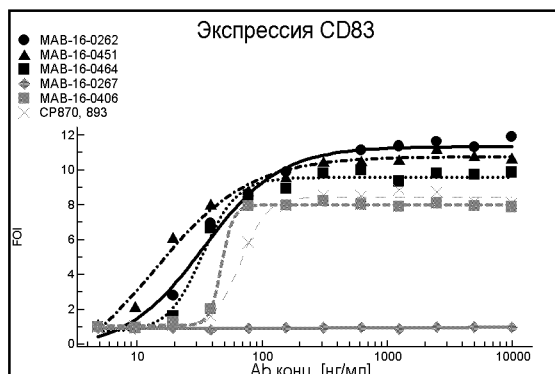
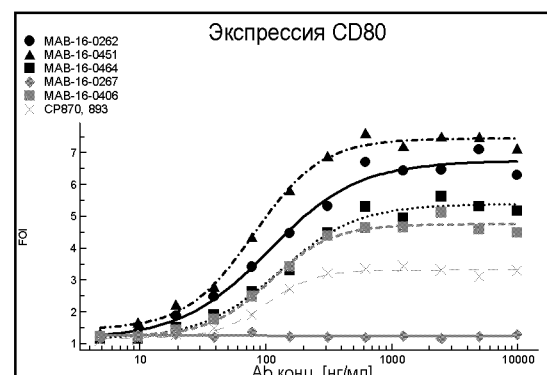
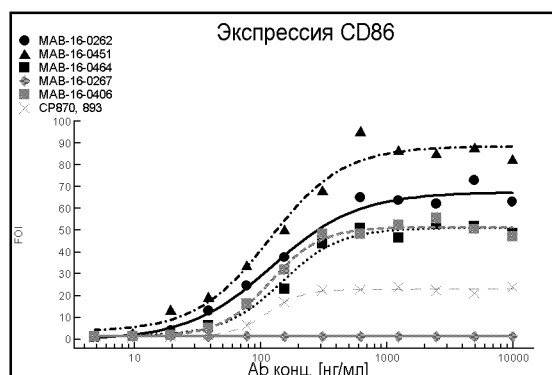
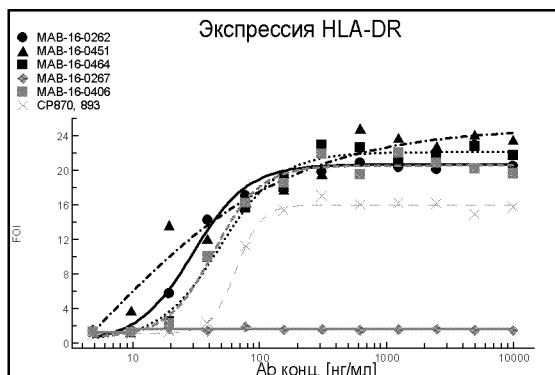
Эксперимент	FACS анализ корцептора (FOI относительно обработки изотипом антитела)						
		HLA-DR	CD86	CD80	CD83	CD54	CD95
Донор 1	CP870 IgG1 LALA	1,3	1,3	1,1	н.д.	н.д.	н.д.
	CP870 IgG2	6,1	3,9	1,9	н.д.	н.д.	н.д.
	MAB-16-0451	11,5	16,6	3,8	н.д.	н.д.	н.д.
	MAB-16-0262	10,7	13,0	3,2	н.д.	н.д.	н.д.
	MAB-16-0464	10,9	7,5	2,4	н.д.	н.д.	н.д.
	MAB-16-0406	8,3	7,5	1,9	н.д.	н.д.	н.д.
	MAB-16-0267	1,0	1,2	1,0	н.д.	н.д.	н.д.
	CD40L	8,8	7,4	1,8	н.д.	н.д.	н.д.
Донор 2	CP870 IgG2	5,5	5,7	2,2	7,4	н.д.	н.д.
	MAB-16-0451	5,5	9,9	3,5	5,8	н.д.	н.д.
	MAB-16-0262	6,2	11,4	3,7	7,4	н.д.	н.д.
	MAB-16-0464	7,2	9,6	2,8	7,4	н.д.	н.д.
	MAB-16-0406	6,3	8,2	2,2	6,5	н.д.	н.д.
	MAB-16-0267	0,8	0,9	0,8	0,7	н.д.	н.д.
Донор 3	CP870 IgG1 LALA	2,2	2,8	1,4	2,4	1,8	1,2
	CP870 IgG2	3,6	7,5	2,0	4,4	3,0	1,4
	MAB-16-0451	3,4	19,3	4,1	4,2	1,9	1,5
	MAB-16-0262	3,2	17,2	3,5	4,6	2,7	1,5
	MAB-16-0464	4,2	16,3	3,2	4,2	2,5	1,5
	MAB-16-0406	3,0	12,2	2,7	4,0	2,1	1,5
	MAB-16-0267	1,3	1,6	1,3	1,2	1,2	1,1

ФИГ.12

		ИФА [нг/мл]		Тест-система определения цитокинов [нг/мл]				
		IL12p40	IL12p70	IL-1b	IL-6	IL-10	TNF-a	IL-8
Донор 1	CP870 IgG1 LALA	0,0	40,5	1,7	0,3	0,3	0,0	0,1
	CP870 IgG2	11,3	60,4	1,6	0,2	0,0	0,2	0,0
	MAV-16-0451	124,3	464,1	26,9	2,9	7,4	17,6	0,2
	MAV-16-0262	87,4	277,4	10,0	1,3	2,6	4,9	0,1
	MAV-16-0464	67,2	202,5	5,7	0,7	0,8	2,3	0,1
	MAV-16-0406	33,1	232,5	3,6	0,8	0,9	0,3	0,1
	MAV-16-0267	0,0	43,7	2,3	0,1	0,1	0,0	0,1
	CD40L	0,0	78,8	1,4	0,2	0,1	0,0	0,0
	Контроль IgG1-LALA		16,7	2,1	0,1	0,0	0,0	0,1
Донор 2	CP870 IgG2	9,6	6,8	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
	MAV-16-0451	256,3	124,7	11,6	0,1	3,5	13,0	0,0
	MAV-16-0262	124,8	80,3	6,3	0,0	1,5	5,2	0,0
	MAV-16-0464	55,2	28,2	1,2	0,0	0,1	0,0	0,0
	MAV-16-0406	16,1	24,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	MAV-16-0267	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Контроль IgG1-LALA		1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Донор 3	CP870 IgG1 LALA	0,8	9,9	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
	CP870 IgG2	10,8	10,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	MAV-16-0451	135,9	139,2	3,9	0,1	1,1	3,2	0,0
	MAV-16-0262	102,1	89,5	2,7	0,1	0,5	1,2	0,0
	MAV-16-0464	30,1	32,3	0,4	0,0	0,1	0,1	0,0
	MAV-16-0406	9,6	26,9	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	MAV-16-0267	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Контроль IgG1-LALA		3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

9/24

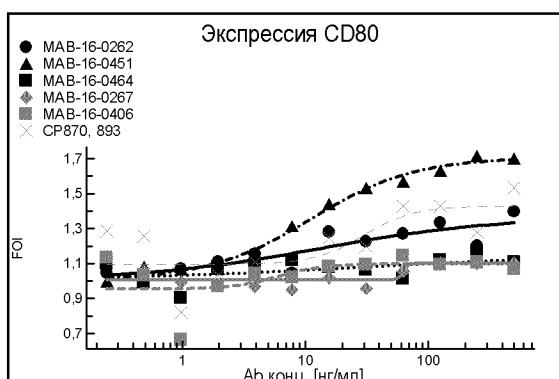
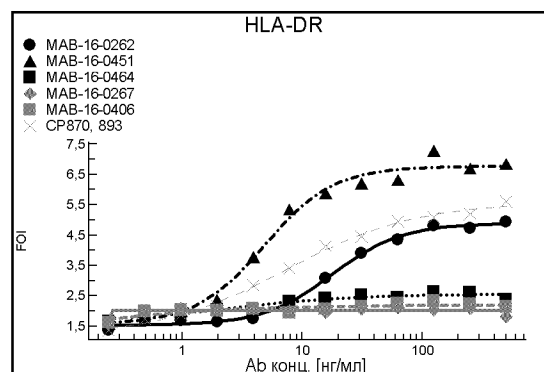
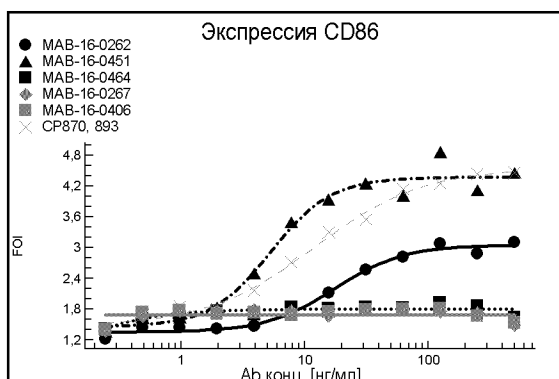
ФИГ.13



FACS анализ корецептора (EC50 в нг/мл)						
Антитело	HLA-DR	CD86	CD80	CD83	CD54	CD95
CP870 IgG2	66	114	100	68	73	73
MAB-16-0451	n.d.	119	81	14	36	71
MAB-16-0262	30	125	107	34	79	143
MAB-16-0464	49	148	129	34	54	89
MAB-16-0406	44	120	110	48	60	85
MAB-16-0267	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.

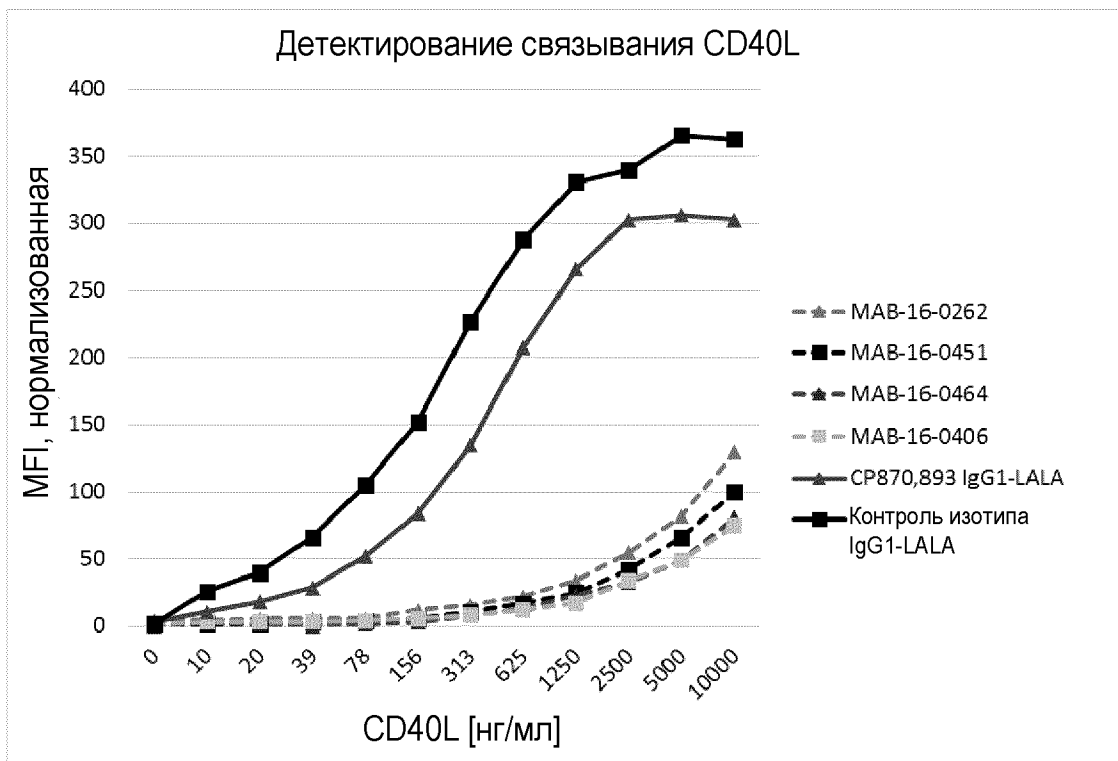
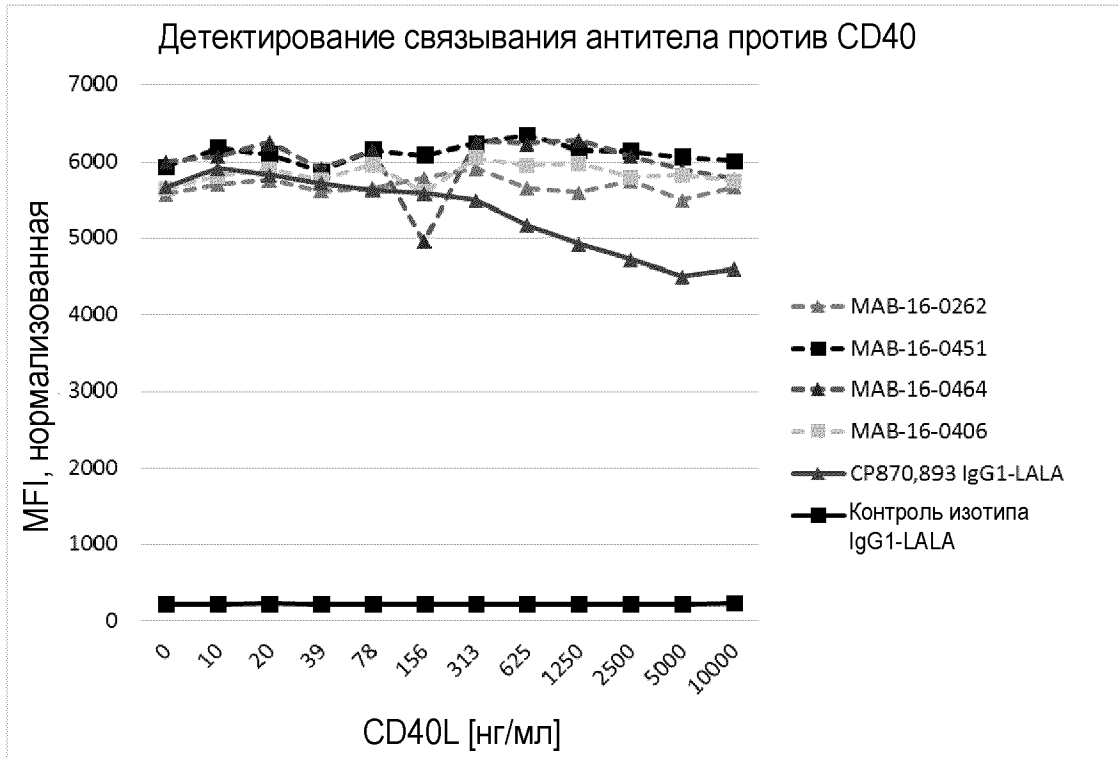
10/24

ФИГ.15

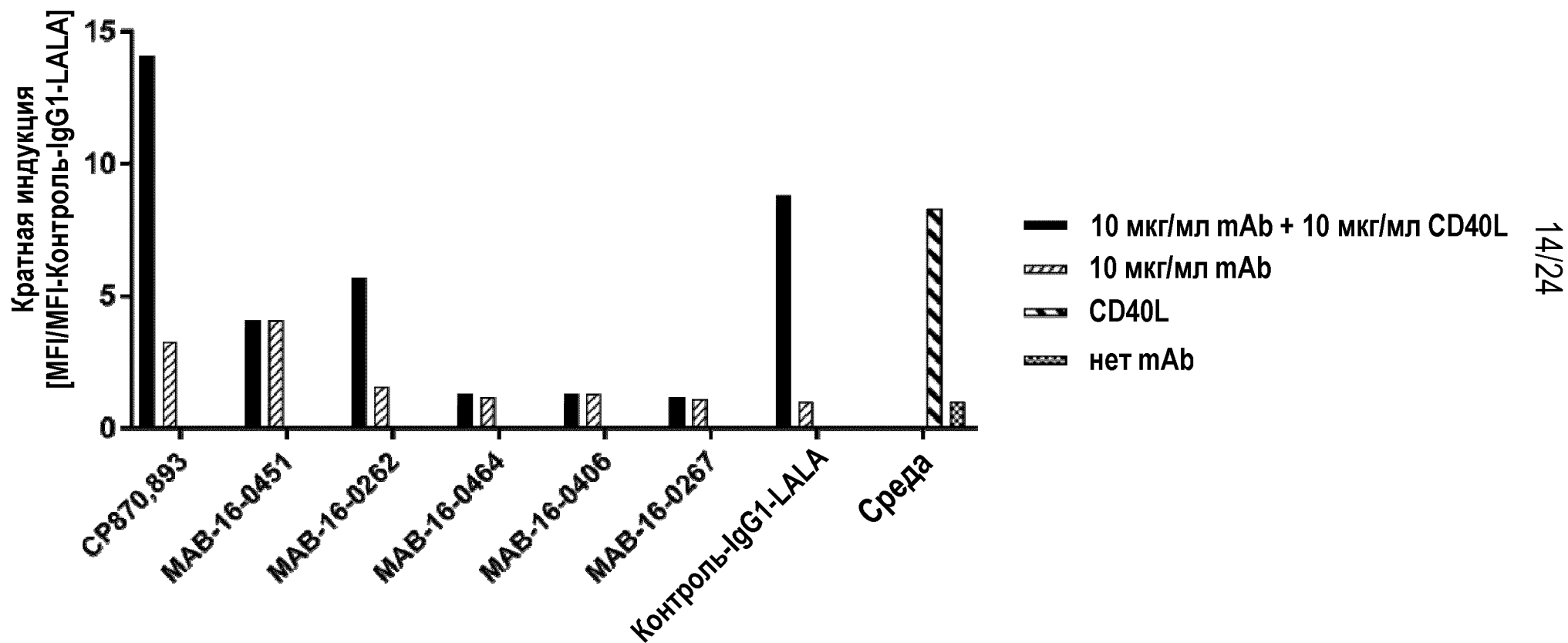


Антитело	FACS анализ корцептора (EC50 в нг/мл)		
	HLA-DR	CD86	CD80
CP870 IgG2	8	12	н.д.
МАВ-16-0451	5	5	11
МАВ-16-0262	18	18	н.д.
МАВ-16-0464	н.д.	н.д.	н.д.
МАВ-16-0406	н.д.	н.д.	н.д.
МАВ-16-0267	н.д.	н.д.	н.д.

ФИГ.16



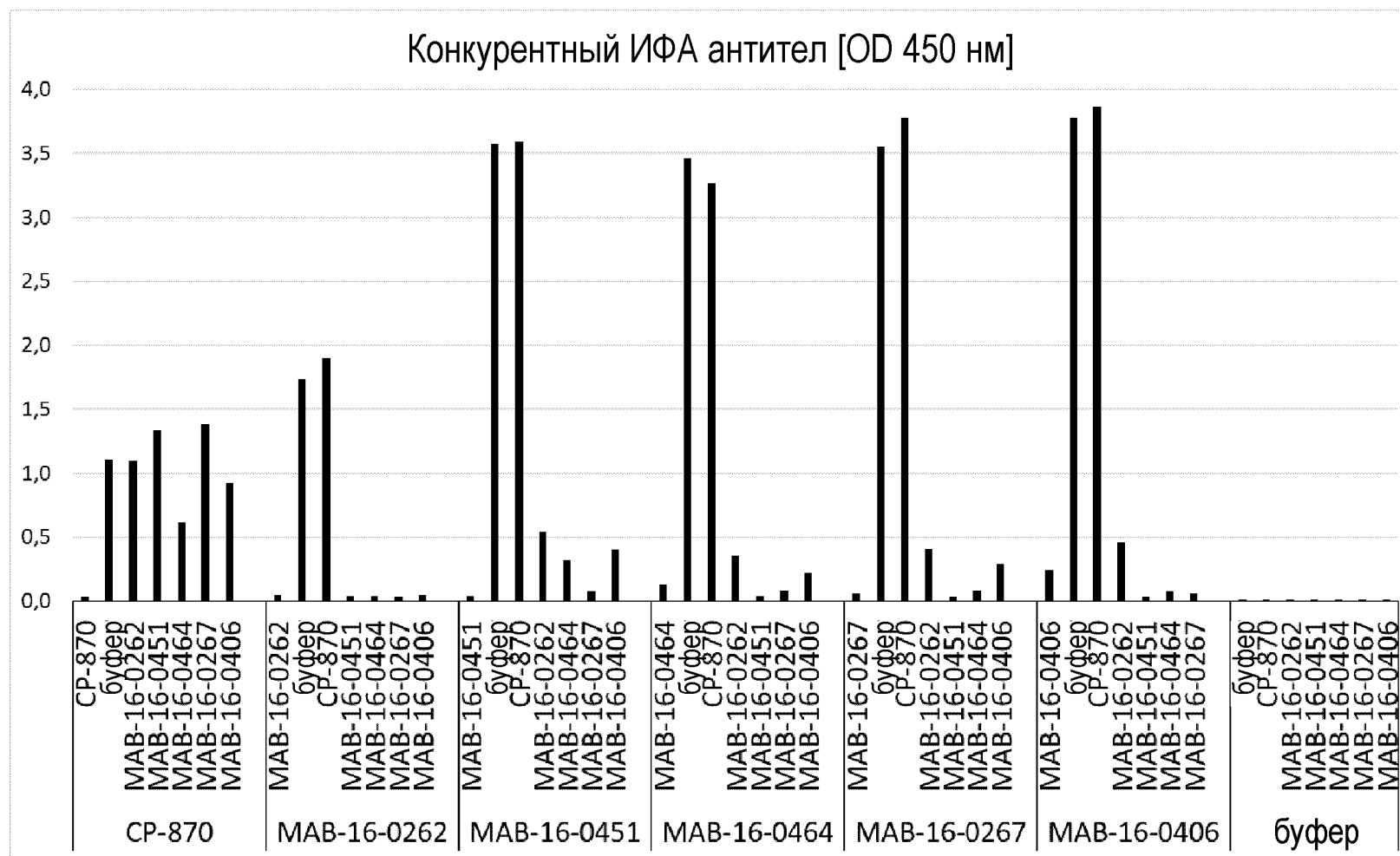
ФФИГ.17



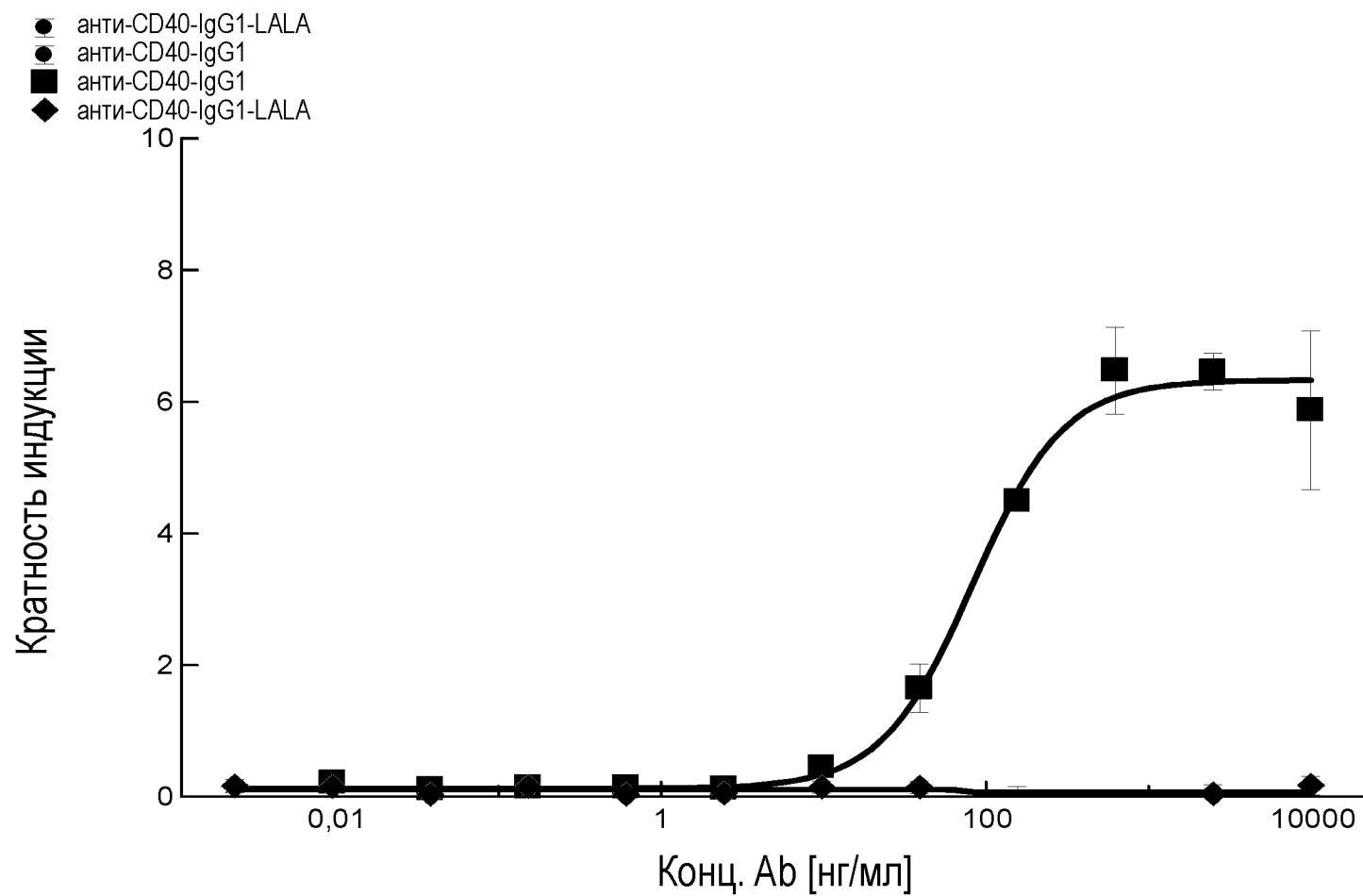
ФИГ.18

	K_D (нМ)
Ab MAB-16-0262/человеческий CD40	15.7 ± 1.1
Ab MAB-16-0451/человеческий CD40	1.2 ± 0.0
Ab MAB-16-0464/человеческий CD40	2.6 ± 0.0
CP-870,893/человеческий CD40	8.9 ± 1.4
Ab MAB-16-0262/сүно CD40	10.3 ± 0.2
Ab MAB-16-0451/сүно CD40	0.8 ± 0.0
Ab MAB-16-0464/сүно CD40	2.2 ± 0.1

ФИГ.19



ФИГ.20



ФИГ.21

Антитело	Мышь	Температура тела в день 3 [°C]	Выживаемость в день 3
CP-870,893	1	31,3	-
	2	34,8	+
	3	35,5	+
	4	32,3	-
	5	32,6	-
	6	35,5	+
hlgG2	1	35,8	+
	2	35,5	+

Антитело	Мышь	Температура тела в день 4 [°C]	Выживаемость в день 4-24
MAV-16-0451	1	36,9	+
	2	36,6	+
	3	36,2	+
hlgG1	1	37,0	+

ФИГ.22 Последовательности (аминокислоты в однобуквенном коде)

Полные последовательности переменных областей (VR):

Тяжелая цепь: VH полная: SEQ ID NO: 1-14
 Легкая цепь: VL полная: SEQ ID NO: 15-28

Название мАВ	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR тяжелой цепи
MAB-16-0283	1	EVQLEESGGDLVQPGASLRRLSCAASGF SFSFSYWCWVRQAPGKGLELVSCIYTTSGS TYYASWAKGRFTISIDNSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARSSGVSPSYFHLWGQGT LVTVSS
MAB-16-0377	2	EVQLEESGGGLVQPGASLRRLSCAASGF SFSGYWMCWVRQAPGKGLEWVGCITYTNSGVT YYANWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGGAIYNDYDYAFYYSLWG QGT LVTVSS
MAB-16-0267	3	EVQLEESGGDLVQPGASLRRLSCAASGFDFNSNAMS WVRQAPGKGLEWVASIYAGGSGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGITRLPLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0386	4	EVQLEESGGDLVQPGASLRRLSCAVSGFDFSSNAMS WVRQAPGKGLEWVSSIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKDASKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGVTRLPLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0451	5	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSNTMCWVRQAPGKGLEWVACIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKDISKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGLSRFS LWGQGT LVTVS S
MAB-16-0346	6	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSTNAVSWVRQAPGKGLEWVGSISAGSSGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGYTYLTLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0325	7	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSNAMS WVRQAPGKGP EWVVTIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGATY LTLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0388	8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSNAMS WVRQAPGKGLEWVGIIYAGSSGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGATYITLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0464	9	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSNAMS WVRQAPGKGLEWVGTIYAGSNGN TDYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGASYFTLWGQGT LVTVS S
MAB-16-0262	10	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSTNAMCWVRQAPGKGLEWVACIAAGSSII TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARGLSRFALWGQGT LVTVS S
MAB-16-0406	11	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYYYMCWVRQAPGKGP EWVACYSNGDGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGADYSAGAAAFNLWGQG TLVTVSS
MAB-16-0484	12	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYYYICWVRQAPGKGP EWVACFANGDGS TYYASWAKGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGADYSGAAAFNLWGQG TLVTVSS
MAB-16-0400	13	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYFYMCWVRQAPGKGLEWVACIGPGVSG DTYYASWAKGRFTISGDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGVDYTYGDAGAAFN LW GQGT LVTVSS
MAB-16-0489	14	EVQLEESGGGLVQPGASLRRLSCAASGIDFSRYFYVCWVRQAPGKGLEWVGC FANHDDS IYYAGWMNGRFTISKDTSKTTLYLQMNSLRAEDTATYFCARGVDYTVGYGGA AFNLWG QGT LVTVSS

Название mAB	SEQ ID NO.	Полная последовательность VR легкой цепи k
MAB-16-0283	15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYSASKLPSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYHCQTYYYSSSSSYDYFGQGTKVVIK
MAB-16-0377	16	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYKASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYYGSSISYNAFGQGTKVVIK
MAB-16-0267	17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGTYYGSTTISAFQGQTKVVIK
MAB-16-0386	18	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGTVYGSSTISAFQGQTKVVIK
MAB-16-0451	19	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYDASKLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGGDYGSYVVAFGGGTKVVIK
MAB-16-0346	20	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASHISSTYLSWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYTDYGSYVSTFGQGQTKVVIK
MAB-16-0325	21	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLPSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYYSSTTYDSTAFQGQTKVVIK
MAB-16-0388	22	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGSYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYYSSTTTTYDSSAFQGQTKVVIK
MAB-16-0464	23	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVVSNRLAWYQQKPGQAPKLLIYLASTLPSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGYKSSSTDGTAFGQGQTKVVIK
MAB-16-0262	24	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGQAPKLLIYLTSTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGYSSSYVSNFGQGQTKVVIK
MAB-16-0406	25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESIGNALVWYQQKPGQAPKLLIYRASILASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYYSSTYNTFGQGQTKVVIK
MAB-16-0484	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSRLAWYQQKPGQAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYYSSTYNAFGQGQTKVVIK
MAB-16-0400	27	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSYLAWYQQKPGQAPKLLIYRASILASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQTYYSRTYSYGSYVNAFGQGQTKVVIK
MAB-16-0489	28	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGSYLSWYQQKPGQAPKLLIYRATTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYRDSYSSSAFGQGQTKVVIK

Области, определяющие комплементарность (CDR):

Тяжелая цепь: CDR-H1: SEQ ID NO: 29-42
 CDR-H2: SEQ ID NO: 43-56
 CDR-H3: SEQ ID NO: 57-70

Название mAB	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_H1
MAB-16-0283	29	FSYWIC
MAB-16-0377	30	GYWMC
MAB-16-0267	31	SNAMS
MAB-16-0386	32	SNAMS

MAB-16-0451	33	SNTMC
MAB-16-0346	34	TNAVS
MAB-16-0325	35	SNAMS
MAB-16-0388	36	SNAMS
MAB-16-0464	37	SNAMS
MAB-16-0262	38	TNAMC
MAB-16-0406	39	RYYMC
MAB-16-0484	40	RYYIC
MAB-16-0400	41	RYFYMC
MAB-16-0489	42	RYFYVC

Название mAB	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_H2
MAB-16-0283	43	CIYTTSGSTYYASWAKG
MAB-16-0377	44	CIYTNSGVTYIANWAKG
MAB-16-0267	45	SIYAGGSGSTYYASWAKG
MAB-16-0386	46	SIYAGSSGSTYYASWAKG
MAB-16-0451	47	CIYAGSSGSTYYASWAKG
MAB-16-0346	48	SISAGSSGSTYYASWAKG
MAB-16-0325	49	TIYAGSSGSTYYASWAKG
MAB-16-0388	50	I IYAGSSGSTYYASWAKG
MAB-16-0464	51	TIYAGSNGNTDYASWAKG
MAB-16-0262	52	CIAAGSSIITYYASWAKG
MAB-16-0406	53	CYSNGDGSTYYASWAKG
MAB-16-0484	54	CFANGDGSTYYASWAKG
MAB-16-0400	55	CIGPGVSGDTYYASWAKG

MAB-16-0489	56	CFANHDDSIYYAGWMNG
-------------	----	-------------------

Название мАВ	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_H3
MAB-16-0283	57	SSGVSYPSYFHL
MAB-16-0377	58	GGAIYNDYDYAFYYSL
MAB-16-0267	59	GITRLPL
MAB-16-0386	60	GVTRLPL
MAB-16-0451	61	GLSRFSL
MAB-16-0346	62	GYTYLTL
MAB-16-0325	63	GATYLTL
MAB-16-0388	64	GATYITL
MAB-16-0464	65	GASYFTL
MAB-16-0262	66	GLSRFAL
MAB-16-0406	67	GADYSAGAAAFNL
MAB-16-0484	68	GADYSGGAAAFNL
MAB-16-0400	69	GVDYTYGDAGAAAFNL
MAB-16-0489	70	GVDYTVGYGGAAAFNL

Легкая цепь: CDR-L1: SEQ ID NO: 71-84
 CDR-L2: SEQ ID NO: 85-98
 CDR-L3: SEQ ID NO: 99-112

Название мАВ	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_L1
MAB-16-0283	71	QASQSISSYLA

MAB-16-0377	72	QASQSISSYLA
MAB-16-0267	73	QASQSISSYLA
MAB-16-0386	74	QASQSISSYLA
MAB-16-0451	75	QASQSISNYLA
MAB-16-0346	76	QASHSISSTYLS
MAB-16-0325	77	QASQSISNYLS
MAB-16-0388	78	QASQSIGSYLA
MAB-16-0464	79	QASESVVSNRLA
MAB-16-0262	80	QASQSISSYLS
MAB-16-0406	81	QASESIGNALV
MAB-16-0484	82	QASQSISSRLA
MAB-16-0400	83	QASQSISSYLA
MAB-16-0489	84	QASQSIGSYLS

Название mAB	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_L2
MAB-16-0283	85	SASKLPS
MAB-16-0377	86	KASTLAS
MAB-16-0267	87	DASKLAS
MAB-16-0386	88	DASTLAS
MAB-16-0451	89	DASKLAS
MAB-16-0346	90	RASTLAS
MAB-16-0325	91	RASTLPS
MAB-16-0388	92	RASTLAS
MAB-16-0464	93	LASTLPS
MAB-16-0262	94	LTSTLAS

MAB-16-0406	95	RASILAS
MAB-16-0484	96	RASTLAS
MAB-16-0400	97	RASILAS
MAB-16-0489	98	RATTLAS

Название mAB	SEQ ID NO.	Последовательность CDR_L3
MAB-16-0283	99	QTYYYSSSSSYDYG
MAB-16-0377	100	QSYYGSSSISYNA
MAB-16-0267	101	QGTYYGSTTISA
MAB-16-0386	102	QGTVYGSSTISA
MAB-16-0451	103	QGGDYYGSSYVVA
MAB-16-0346	104	QYTDYGSSYVST
MAB-16-0325	105	QGYYSSTTYDSTA
MAB-16-0388	106	QGYYSSTTTTYDSSA
MAB-16-0464	107	AGYKSSSTDGTA
MAB-16-0262	108	QGYYSSTSYVSNQ
MAB-16-0406	109	QDYYSSTEYNT
MAB-16-0484	110	QDYYSSTEYNA
MAB-16-0400	111	QTYYSRTYSYGSPNA
MAB-16-0489	112	QSYRDSSSSA