

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192015** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.10.20

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

(22) Дата подачи заявки
2020.01.30

(54) **НОВЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ CD40 АНТИТЕЛА**

(31) 2022494; 2024087

(32) 2019.02.01; 2019.10.23

(33) NL

(86) PCT/NL2020/050051

(87) WO 2020/159368 2020.08.06

(71) Заявитель:
ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Ван Дер Влит Йоханнес Йелле, Де
Веердт Ирис, Де Грюейль Таня Дениз,
Паррен Пол, Катер Арон Филип,
Шеффер Джордж Лодевийк (NL)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Пармонова К.В., Прищепный
С.В. (RU)

(57) Описаны новые антитела, способные связывать CD40 человека, и новые мультиспецифические антитела, способные связывать CD40 человека и способные связывать рецептор Vγ9Vδ2 Т-клеток человека. Дополнительно описаны фармацевтические композиции, включающие антитела по изобретению, и применение антител по изобретению для медицинского лечения.

A1

202192015

202192015

A1

Новые связывающие CD40 антитела

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым антителам, способным связывать CD40 человека, и новым мультиспецифическим антителам, способным связывать CD40 человека и способным связывать рецептор $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток человека. Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, включающим антитела по изобретению, и применению антител по изобретению для медицинского лечения.

Уровень техники

CD40 представляет собой костимулирующий рецептор, присутствующий на большом ряде типов клеток, включая В-лимфоциты, дендритные клетки, моноциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, гемопоэтические клетки-предшественники, тромбоциты и базальные эпителиальные клетки. Связывание лиганда CD40 (CD40L) с CD40 активирует внутриклеточные пути передачи сигнала, которые продуцируют различные биологические эффекты в зависимости от типа клеток и микросреды. Связывание CD40/CD40L играет роль при атеросклерозе, отторжении трансплантата, коагулировании, борьбе с инфекцией и аутоиммунитете. Многие опухолевые клетки также экспрессируют CD40, включая В-клеточные злокачественные опухоли и солидные опухоли, что делает CD40 потенциальной мишенью для лечения рака (Vonderheide (2007) Clin Cancer Res 13:1083).

Для терапии рака рассматривались как агонистические, так и антагонистические в плане CD40 лекарства. Наиболее часто выбирались агонисты CD40 на основе двойного обоснования: во-первых, агонисты CD40 могут инициировать иммунное стимулирование путем активации антигенпрезентирующих клеток хозяина, которые затем направляют Т-клеточные ответы, направленные против опухолей, вызывая гибель

опухолевых клеток. Во-вторых, лигирование CD40 может вызывать прямую опухолевую цитотоксичность в опухолях, которые экспрессируют CD40 (в Vonderheide (2007) Clin Cancer Res 13:1083). Tai et al. (2005) Cancer Res 65: 5898 описана противоопухолевая активность антагонистического антитела человека против CD40 (лукатумумаб, CHIR-12.12 или HCD 122) против множественной миеломы. Была определена умеренная активность у пациентов с рецидивом/невосприимчивых к лечению с лимфомой на поздней стадии (Fanala et al. (2014) Br J Haematol 164:258). Другое антагонистическое в плане CD40 антитело было исследовано в качестве потенциального средства лечения аутоиммунных заболеваний (Schwabe et al. (2018) J Clin Pharmacol, Aug 16).

Несмотря на значительный прогресс, на сегодняшний день ни одно из CD40 антител не было одобрено для медицинского применения, при этом по-прежнему сохраняется потребность в новых CD40 антителах, которые являются терапевтически эффективными и в то же время имеют приемлемую цитотоксичность.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым антителам для терапии на основе CD40. Были сконструированы биспецифические антитела, в которых CD40-связывающие участки были объединены со связывающими участками, способными связывать рецептор $V\gamma 9V\delta 2$ T-клеток и, таким образом, связывать $V\gamma 9V\delta 2$ T-клетки. Неожиданно было определено, что биспецифические антитела были способны антагонизировать стимулирование CD40 и эффективно опосредовать уничтожение клеток первичного хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), а также клеток первичной множественной миеломы (ММ). Уничтожение являлось эффективным даже при стимулировании клеток ХЛЛ с помощью CD40L. Более того, биспецифические антитела

сенсibilizировали ХЛЛ клетки в отношении венетоклакса, блокатора Bcl-2, используемого при лечении ХЛЛ.

Биспецифические взаимодействующие с Т-клетками антитела, обладающие специфичностью связывания с мишенью в виде опухоли и специфичностью связывания Т-клеток, были описаны в данной области, см., например, Huehls et al. (2015) *Immunol Cell Biol* 93:290; Ellerman (2019) *Methods*, 154:102; de Bruin et al. (2017) *Oncoimmunology* 7(1):e1375641 and WO2015156673. Однако результаты значительно варьируются от одной опухоли-мишени к другой. Например, в одном исследовании, в котором фрагмент, связывающийся с мишенями в виде Т-клеток (CD3), комбинировали со связывающимися фрагментами против 8 различных мишеней в виде В-клеток (CD20, CD22, CD24, CD37, CD70, CD79b, CD138 и HLA-DR), было определено, что биспецифические антитела, нацеленные против различных мишеней в виде опухолей, демонстрировали сильную вариативность в плане цитотоксической способности, при этом цитотоксичность не коррелировала с уровнями экспрессии антигенов. Например, биспецифические антитела на основе CD30, нацеленные против HLA-DR или CD138, не были способны индуцировать цитотоксичность, несмотря на уровни экспрессии HLA-DR и CD138 от умеренных до высоких (Engelberts et al. (2020) *Ebiomedicine* 52:102625).

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает мультиспецифическое антитело, включающее первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связывать рецептор V γ 9V δ 2 Т-клеток человека.

Во втором аспекте изобретение предусматривает антитело, включающее первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, при этом антитело конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или конкурирует

за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

В дополнительных аспектах изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим антитела по изобретению, применению антител по изобретению в медицинском лечении, и конструктам нуклеиновых кислот, векторам экспрессии для продуцирования антител по изобретению, и клеткам-хозяевам, включающим такие конструкты нуклеиновых кислот или вектор экспрессии.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения описаны ниже.

Описание фигур

Фиг.1: VHH против CD40 связываются с экспрессирующими CD40 клетками. (A) Экспрессия CD40 на HEK293T клетках дикого типа (закрашенная гистограмма) и CD40-трансфицированных HEK293T клетках (незакрашенная гистограмма). (B) CD40-отрицательные HEK293T клетки дикого типа или CD40-трансфицированные HEK293T клетки инкубировали с V12t (1 μ M), V15t (1 μ M), V19t (1 μ M) или контрольной средой и далее детектировали Мус-метку с помощью проточной цитометрии. Показаны соответствующие гистограммы, полученные в рамках 3 независимых экспериментов.

Фиг.2: VHH против CD40 связываются с клетками первичного ХЛЛ. (A) Экспрессия CD40 на клетках первичного ХЛЛ (черная гистограмма: неокрашенный контроль, серая гистограмма: окрашивание на основе CD40-PE). Показан соответствующая гистограмма 5 протестированных образцов. (B) Клетки первичного ХЛЛ (n=5) инкубировали с V12t (1 μ M), V15t (1 μ M), V19t (1 μ M) или контрольной средой и далее детектировали Мус-метку с помощью проточной цитометрии. Данные представляют собой среднее значение и стандартную ошибку среднего (SEM). **P* <0,05 (B: односторонний

дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении без использования VHH).

Фиг.3: VHH против CD40 не являются агонистами CD40. Клетки первичного ХЛЛ (n=6) культивировали с указанными концентрациями VHH против CD40, gmCD40L (100 нг/мл) или контрольной средой в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии. (A) Жизнеспособность (B) экспрессия CD86 и (C) экспрессия CD95 относительно контрольной среды. Данные представляют собой среднее значение и SEM. * $P < 0.05$. (A-C: односторонний дисперсионный анализ и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой).

Фиг.4: Моновалентные VHH V15t и V19t антагонизируют стимулирование CD40. Клетки первичного ХЛЛ (n=6) предварительно инкубировали с моновалентным VHH против CD40 или контрольной средой в течение 30 минут и затем культивировали в присутствии рекомбинантного мультимерного CD40L (100 нг/мл) в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии. (A) Жизнеспособность (B) экспрессия CD86 и (C) экспрессия CD95 относительно контрольной среды. Данные представляют собой среднее значение и SEM. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. (A-C: односторонний дисперсионный анализ и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой).

Фиг.5: V19S76K-5C8 связываются с экспрессирующими CD40 клетками. CD40-отрицательные HEK293T клетки дикого типа или CD40-трансфицированные HEK293T клетки инкубировали с V19S76K-5C8 (1 мкМ) или контрольной средой и детектировали связанное биспецифическое VHH антитело с использованием антител против тяжелых и легких цепей IgG ламы с помощью проточной цитометрии. Показаны соответствующие гистограммы, полученные в рамках 3 независимых экспериментов.

Фиг.6: V19S76K-5C8 связываются с CD40⁺ и V γ 9V δ 2⁺ клетками. Линии клеток инкубировали с V19S76K-5C8 или контрольной средой и детектировали

связанное биспецифическое VHH антитело с использованием антител против тяжелых и легких цепей IgG ламы с помощью проточной цитометрии. (A) Гистограммы и (B) нелинейный регрессионный анализ связывания V19S76K-5C8 с полученными от здоровых доноров линиями V γ 9V δ 2 T-клеток (n=3). (C) Гистограммы и (D) нелинейный регрессионный анализ связывания V19S76K-5C8 с полученной от здоровых доноров линией клеток CD40⁺ CII (n=3). (A, C) данные обозначают среднее значение и SEM; (B, D): данные обозначают среднее значение (символы), диапазон (планки погрешностей), KD (вертикальная линия) и 95% доверительный интервал (затемненная область). **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001. (A, C: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении без использования биспецифического VHH антитела; B, D: нелинейный регрессионный анализ).

Фиг.7: V19S76K-5C8 не является агонистом CD40. Клетки первичного ХЛЛ (n=6) культивировали с указанными концентрациями V19S76K-5C8, gmCD40L (100 нг/мл) или контрольной средой в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии. (A) экспрессия CD80, (B) экспрессия CD86 и (C) экспрессия CD95 относительно контрольной среды. Данные представляют собой среднее значение и SEM. **P* < 0,05. (A-C: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой).

Фиг.8: V19S76K-5C8 является агонистом CD40. Клетки первичного ХЛЛ (n=6) предварительно инкубировали с указанными концентрациями V19S76K-5C8 или контрольной средой в течение 30 минут и затем культивировали в присутствии рекомбинантного мультимерного CD40L (100 нг/мл) в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии. (A) экспрессия CD80, (B) экспрессия CD86 и (C) экспрессия CD95 относительно контрольной среды. Данные представляют собой среднее значение и SEM. **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001, *****P* < 0,0001. (A-C: односторонний дисперсионный

анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой).

Фиг.9: V19S76K-5C8 сенсibiliзирует клетки первичного ХЛЛ в отношении венетоклакса. Клетки первичного ХЛЛ предварительно инкубировали с V19S76K-5C8 (1000 нМ) или контрольной средой в течение 30 минут и затем культивировали в присутствии рекомбинантного мультимерного CD40L (100 нг/мл) в течение 48 часов. (А) Затем клетки культивировали с венетоклаксом (АВТ-199) в течение 24 часов и измеряли жизнеспособность с помощью проточной цитометрии (n=6). (В) Спустя 48 часов анализировали экспрессию Vcl-xL с помощью проточной цитометрии (n=3). Специфический лизис вычисляли следующим образом: (% гибели клеток среди АВТ-199 клеток) – (% гибели клеток среди необработанных клеток) / (% жизнеспособных клеток среди необработанных клеток) * 100. Данные представляют собой среднее значение и SEM. ****P* < 0,001, *****P* < 0,0001. (А-С: двусторонний дисперсионный анализ и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой, В: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с контрольной средой).

Фиг.10: V19S76K-5C8 активирует Vγ9Vδ2 Т-клетки. Размноженные Vγ9Vδ2 Т-клетки (n=3) культивировали с V19S76K-5C8 и мишенями в виде CD40⁺ СИИ клеток при соотношении 1:1 в течение 4 часов в присутствии брэфельдина А, моненсина, и антитела против CD107a для измерения дегрануляции и внутриклеточного продуцирования цитокинов с помощью проточной цитометрии. Экспрессия Vγ9Vδ2 Т-клетками (А) CD107a, (В), IFN-γ, (С) TNF-α и (D) IL-2. Данные представляют собой среднее значение и SEM. **P* < 0,05 (А- D: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с наличием мишеней и при отсутствии (0 пМ) биспецифического VHH антитела).

Фиг.11: V19S76K-5C8 повышает цитотоксичность против CD40⁺ клеток. Мишени в виде CD40⁺ CII клеток культивировали в течение ночи с размноженными Vγ9Vδ2 T-клетками при соотношении 1:1 в присутствии V19S76K-5C8 и измеряли жизнеспособность с помощью проточной цитометрии (n=5). (A) Гистограммы и (B) нелинейный регрессионный анализ индуцированной биспецифическим VHH антителом цитотоксичности. Показатели гибели клеток скорректированы с учетом естественной гибели клеток при условиях без использования Vγ9Vδ2 T-клеток путем вычисления следующим образом: $(\% \text{ гибели клеток среди обработанных клеток}) - (\% \text{ гибели клеток среди необработанных клеток}) / (\% \text{ жизнеспособных клеток среди необработанных клеток}) * 100$. (A) данные обозначают среднее значение и SEM; (B): данные обозначают среднее значение (символы), диапазон (планки погрешностей), KD (вертикальная линия) и 95% доверительный интервал (затемненная область). **P* < 0,05, ***P* < 0,01. (A: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с использованием Vγ9Vδ2 T-клеток и при отсутствии (0 нМ) биспецифического VHH антитела; B: нелинейный регрессионный анализ).

Фиг.12: Цитотоксичность V19S76K-5C8 является C40-специфической. CD40-отрицательные HEK293T клетки дикого типа или CD40-трансфицированные HEK293T клетки культивировали в течение ночи с размноженным Vγ9Vδ2 T-клетками при соотношении 1:1 в присутствии V19S76K-5C8. Жизнеспособность измеряли с помощью проточной цитометрии (n=3). Показатели гибели клеток скорректированы с учетом естественной гибели клеток при условиях без использования Vγ9Vδ2 T-клеток путем вычисления следующим образом: $(\% \text{ гибели клеток среди обработанных клеток}) - (\% \text{ гибели клеток среди необработанных клеток}) / (\% \text{ жизнеспособных клеток среди необработанных клеток}) * 100$. Данные обозначают среднее значение и SEM. *****P* < 0,0001. (анализ смешанных эффектов с помощью

апостериорного теста Сидака для сравнения смешанных эффектов CD40-трансфицированных и относящихся к дикому типу и апостериорного теста Сидака для сравнения CD40-трансфицированных и относящихся к дикому типу).

Фиг.13: V12-5C8t, V15-5C8t и V19-5C8t повышают цитотоксичность против клеток первичного ХЛЛ. Мишени в виде ХЛЛ клеток культивировали в течение ночи с размноженными V γ 9V δ 2 Т-клетками при соотношении 1:1 в присутствии биспецифических VHH и измеряли жизнеспособность с помощью проточной цитометрии (n=3). Показатели гибели клеток скорректированы с учетом естественной гибели клеток при условиях без использования V γ 9V δ 2 Т-клеток путем вычисления следующим образом: $(\% \text{ гибели клеток среди обработанных клеток}) - (\% \text{ гибели клеток среди необработанных клеток}) / (\% \text{ жизнеспособных клеток среди необработанных клеток}) * 100$. Данные обозначают среднее значение и SEM. **P* < 0,05. (двусторонний дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки для сравнения среднего значения каждого VHH с каждым другим VHH).

Фиг.14: V19S76K-5C8 является эффективным против стимулированных CD40 клеток ХЛЛ. Образцы МКПК (моноклеарных клеток периферической крови) ХЛЛ (n=3) культивировали на облученных 3Т3 или CD40L⁺-3Т40L фибробластах в течение 72 часов. Затем клетки культивировали в течение ночи с контрольной средой, полученными от здоровых доноров размноженными V γ 9V δ 2 Т-клетками (при соотношении 1:1), полученными от здоровых доноров размноженными V γ 9V δ 2 Т-клетками (при соотношении 1:1) и V19S76K-5C8 (100 нМ), или венетоклаксом (ABT-199, 10 нМ) (n=3). Жизнеспособность измеряли с помощью проточной цитометрии. Показатели гибели клеток скорректированы с учетом естественной гибели клеток при условиях без использования V γ 9V δ 2 Т-клеток путем вычисления следующим образом: $(\% \text{ гибели клеток среди обработанных клеток}) - (\% \text{ гибели клеток среди необработанных клеток}) / (\% \text{ жизнеспособных клеток среди$

необработанных клеток)*100. Данные обозначают среднее значение и SEM. *** $P < 0,001$. (двусторонний дисперсионный анализ и далее апостериорный тест Сидака для сравнения каждого условия обработки между стимулированными ЗТЗ и ЗТ40L клетками ХЛЛ).

Фиг.15: V19S76K-5C8 активирует аутологичные V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ. МКПК от пациентов с ХЛЛ обогащали в плане содержания Т-клеток путем уменьшения содержания CD19⁺ клеток ХЛЛ и затем совместно культивировали с CD19⁺ клетками ХЛЛ (при соотношении 1:1) и V19S76K-5C8 (10 нМ) или контрольной средой в течение 16 часов в присутствии брефельдина А, моненсина и антитела против CD107а для измерения продуцирования (А) IFN- γ , (В) TNF- α , (С) IL-2 и (D) дегрануляции с помощью проточной цитометрии (n=7). Данные обозначают среднее значение и SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. (A-D: парный t-критерий).

Фиг.16: V19S76K-5C8 индуцирует лизис аутологичных клеток ХЛЛ. CD3⁺ клетки и CD19⁺ клетки выделяли из МКПК одного и того же пациента с ХЛЛ и культивировали в течение ночи при соотношении 1:10 с V19S76K-5C8 (10 нМ) или контрольной средой. Живые клетки ХЛЛ подвергали количественному анализу с помощью проточной цитометрии с использованием шариков для подсчета клеток (n=2 пациента с ХЛЛ). ** $P < 0,01$. (парный t-критерий).

Фиг.17: V19S76K-5C8 является активным против первичной множественной миеломы. (А) Пример экспрессии CD40 на клетках первичной ММ при детектировании с помощью конъюгированного с PE антитела против CD40, клона MAB89, Beckman Coulter, IM1936U. Соответствующие гистограммы 4 доноров: (В) Костный мозг пациентов с ММ культивировали в течение ночи при присутствии или отсутствии полученных от здоровых доноров V γ 9V δ 2 Т-клеток при соотношении 1:1 (V γ 9V δ 2 Т-клетка:плазматическая клетка) при присутствии или отсутствии V19S76K-5C8 (10 пМ или 10 нМ). Живые плазматические клетки подвергали количественному анализу с помощью проточной цитометрии с использованием шариков для подсчета клеток (n=5).

(C, D) Мононуклеарные клетки из костного мозга пациентов с ММ культивировали в течение ночи с V19S76K-5C8 (VНН; 10 нМ), аминокислотобисфосфонатом (АБФ; 10 мкМ золедроновой кислоты (положительный контроль)) или контрольной средой в присутствии брэфельдина, моненсина и антитела против CD107a для измерения (C) продуцирования цитокинов и (D) дегрануляции с помощью проточной цитометрии (n=6). Данные представлены в виде среднего значения и SEM. *P <0,05, **P <0,01. (B-D: односторонний дисперсионный анализ с повторными измерениями и далее апостериорный тест Даннета при сравнении с условием без использования антитела).

Фиг.18: Биспецифическое VНН антитело против CD40-Vδ2 пролонгирует выживаемость *in vivo*. Иммунодефицитных NSG мышей подвергали облучению в день -1 и вводили (в/в) $2,5 \cdot 10^6$ ММ.1s клеток в день 0. Мыши получали PBS или Vγ9Vδ2 Т-клетки человека ($1 \cdot 10^7$ клеток; оба в/в) в день 7, 14 и 21 и далее PBS или V19S76K-5C8 (VНН; 5 мг/кг; оба в/в) дважды в неделю начиная с дня 9. (A) Схематический обзор схемы лечения. (B) Анализ Каплана-Майера выживаемости мышей (контроль: n=6; V19S76K-5C8 (VНН): n=6, Vγ9Vδ2 Т-клетки: n=8, Vγ9Vδ2 Т-клетки + V19S76K-5C8 (VНН): n=8). Экспрессия CD40 на ММ.1s клетках (CD45+CD38+ клетки человека) в (C) костном мозге (КМ) и (D) плазмочитомах в момент умерщвления. (E) Масса тела после 7 недель лечения относительно отдельной массы тела во время инъекции опухолей. **P<0,01, ***P <0,001. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. (B: логранговый тест Мантла-Кокса и далее апостериорный тест Холма-Сидака, C: односторонний дисперсионный анализ и далее апостериорный тест Даннета для сравнения с контрольными мышами, D: непарный t-критерий).

Подробное описание изобретения

Определения

Термин "CD40" человека при использовании здесь обозначает белок CD40, также известный как член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 5 (UniProtKB - P25942 (TNR5_HUMAN)), Изоформа I, указан в SEQ ID NO:24.

Термин "V δ 2 человека" при использовании здесь обозначает белок TRDV2, дельта вариабельный рецептор Т-клеток 2 (в UniProtKB - A0JD36 (A0JD36_HUMAN) приведен пример последовательности V δ 2).

Термин "V γ 9 человека" при использовании здесь обозначает белок TRGV9, гамма вариабельный рецептор Т-клеток 9 (в UniProtKB - Q99603_HUMAN приведен пример последовательности V γ 9).

Термин "антитело" обозначает молекулу иммуноглобулина, фрагмент молекулы иммуноглобулина или их производное, которое имеет способность специфически связываться с антигеном при обычных физиологических условиях с полураспадом в виде значительных периодов времени, например, по меньшей мере, около 30 минут, по меньшей мере, около 45 минут, по меньшей мере, около одного часа, по меньшей мере, около двух часов, по меньшей мере, около четырех часов, по меньшей мере, около 8 часов, по меньшей мере, около 12 часов, около 24 часов или более. около 48 часов или более, около 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и так далее, или любого другого соответствующего функционально-определенного периода (например времени, достаточного для индуцирования, промотирования, стимулирования, и/или модулирования физиологического ответа, связанного с антителом, связывающимся с антигеном, и/или времени, достаточного для приобретения антителом эффекторной активности). Антигенсвязывающий участок (или антигенсвязывающий домен), который взаимодействует с антигеном, может включать вариабельные участки как тяжелой, так и легкой цепей молекулы иммуноглобулина, или может представлять собой однодоменный антигенсвязывающий участок, например вариабельный участок только тяжелой цепи. Константные участки антитела, в случае их наличия, могут

опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями-хозяевами или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например эффекторные клетки и Т-клетки) и компонентами системы комплемента, например C1q, первым компонентом в классическом пути активации комплемента. Однако в некоторых вариантах осуществления Fc участок антитела был модифицирован для того, чтобы стать инертным, при этом термин "инертный" обозначает Fc участок, который, по меньшей мере, не способен связываться с каким-либо из Fc γ рецепторов, индуцировать Fc-опосредованное поперечное сшивание FcR, или индуцировать FcR-опосредованное поперечное сшивание антигенов-мишеней за счет двух Fc участков отдельных антител. В дополнительном варианте осуществления инертный Fc участок также не способен связывать C1q. В одном варианте осуществления антитело содержит мутации в положениях 234 и 235 (Canfield and Morrison (1991) J Exp Med 173:1483), например мутацию Leu на Phe в положении 234 и мутацию Leu на Glu в положении 235. В другом варианте осуществления антитело содержит мутацию Leu на Ala в положении 234, мутацию Leu на Ala в положении 235 и мутацию Pro на Gly в положении 329. В другом варианте осуществления антитело содержит мутацию Leu на Phe в положении 234, мутацию Leu на Glu в положении 235 и мутацию Asp на Ala в положении 265.

Как указано выше, термин "антитело" в соответствии с используемым здесь значением, если иное не указано или явно не следует из контекста, включает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может реализовываться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающихся фрагментов, охватываемых здесь термином "антитело", включают (i) Fab' или фрагмент Fab, то есть моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов, или моновалентное антитело, как описано в WO2007059782; (ii)

фрагменты $F(ab')_2$, то есть бивалентные фрагменты, включающие два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из VH и CH1 доменов; и (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из VL и VH доменов одного плеча антитела. Более того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются разными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде единой цепи белка, в которой VL и VH участки соединяются для образования моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Подобные одноцепочечные антитела охватывают термином "антитело", если иное не следует из контекста. Несмотря на то, что подобные фрагменты в целом включаются в значение термина "антитело", они совместно и каждый по отдельности представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и варианты использования. Термин "антитело", если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), химерные антитела и гуманизированные антитела, а также фрагменты антител, полученные любым известным способом, например с помощью ферментативного расщепления, пептидного синтеза, и рекомбинантными способами.

В некоторых вариантах осуществления антител по изобретению первый антигенсвязывающий участок, или антигенсвязывающий участок, или они оба представляют собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела (sdAb, также называемые Nanobody® или VHH) хорошо известны специалистам в данной области, см., например, Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446, Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327 and Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21. Однодоменные антитела включают

один CDR1, один CDR2 и один CDR3. Примеры однодоменных антител представляют собой переменные фрагменты антител, имеющих только тяжелую цепь; антител, которые естественным образом не включают легкие цепи; однодоменных антител, полученных из стандартных антител; и сконструированных антител. Однодоменные антитела могут быть получены от любого вида, включая мышь, человека, верблюда, ламу, акулу, козу, кролика и корову. Например, встречающиеся в природе молекулы V_HH могут быть получены из антител, выращенных в Camelidae (верблюдовых), например верблюде, дромадере, альпаке и гуанако. Подобно цельному антителу, однодоменное антитело способно селективно связываться с определенным антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только переменный домен цепи иммуноглобулина, например CDR1, CDR2 и CDR3, и каркасные участки.

Термин "иммуноглобулин" в соответствии с используемым здесь значением предназначен для обозначения класса структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких цепей (L) и одной пары тяжелых цепей (H), при этом все четыре из них могут быть взаимно соединены дисульфидными связями. Термин "тяжелая цепь иммуноглобулина" или "тяжелая цепь" в соответствии с используемым здесь значением предназначен для обозначения одной из цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь обычно состоит из переменного участка тяжелой цепи (обозначаемого здесь в виде аббревиатуры V_H) и константного участка тяжелой цепи (обозначаемого здесь в виде аббревиатуры C_H), который определяет изотип иммуноглобулина. Константный участок тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: C_H1, C_H2, и C_H3. Константный участок тяжелой цепи дополнительно включает шарнирную область. В рамках структуры иммуноглобулина (например IgG) две тяжелые цепи являются взаимно соединенными дисульфидными связями в шарнирной области. Подобно тяжелым цепям, каждая легкая цепь обычно

состоит из нескольких участков: переменного участка легкой цепи (VL) и константного участка легкой цепи (CL). Более того, VH и VL участки могут быть подразделены на участки на основе гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут являться гипервариабельными в плане последовательности и/или образовывать структурно выраженные петли), также называемые определяющими комплементарность участками (CDR), перемежающиеся участками, которые являются более консервативными, которые называются каркасными участками (FR). Каждый VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR последовательности могут быть определены путем использования различных способов, например способов, указанных у Choitia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901 or Kabat et al. (1991) Sequence of protein of immunological interest, fifth edition. NIH publication. Различные способы определения CDR и нумерации аминокислот можно сравнить на сайте www.abysis.org (UCL).

Термин "изотип" в соответствии с используемым здесь значение обозначает (под)класс иммуноглобулина (например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, ил IgM) или его любой аллотип, например IgG1m(za) и IgG1m(f), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи. Каждый изотип тяжелой цепи может быть объединен с каппа (κ) или лямбда (λ) тяжелой цепью. Антитело по изобретению может иметь любой изотип.

Термин "полноразмерное антитело" в соответствии с используемым здесь значением обозначает антитело, которое содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи, соответствующие тем, которые обычно располагаются в антителе дикого типа данного изотипа.

Термин "химерное антитело" обозначает антитело, в котором переменный участок получен от не представляющего собой человека вида (например получен от грызунов), а константный участок получен от другого

вида, например человека. Химерные антитела могут быть получены путем генетической модификации. Для снижения иммуногенности антител разрабатываются химерные моноклональные антитела для терапевтических видов использования.

Термин "гуманизированное антитело" обозначает генетически модифицированное антитело не являющегося человеком вида, которое содержит константные домены антитела человека и переменные домены не являющегося человеком вида, модифицированные для достижения высокого уровня гомологичности последовательности относительно переменных доменов человека. Это может быть достигнуто путем переноса шести определяющих комплементарность участков (CDR) антитела не являющегося человеком вида, которые совместно образуют антигенсвязывающий участок, в гомологичный участок акцепторного каркаса человека (FR). Для полного воссоздания аффинности связывания и специфичности исходного антитела может потребоваться замещение каркасных остатков исходного антитела (например антитела не являющегося человеком вида) на каркасные участки человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных участках, которые являются важными в плане свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может включать CDR последовательности не являющегося человеком вида, в основном каркасные участки человека, необязательно включающие одну или несколько аминокислотных обратных мутаций на аминокислотную последовательность не являющегося человеком вида и, необязательно, полностью относящиеся к человеку константные участки. Необязательно, могут быть введены дополнительные аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями, для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, например аффинностью и биохимическими свойствами. Гуманизация терапевтических антител не

являющегося человеком вида осуществляется для минимизации их иммуногенности у человека, в то время как подобные гуманизированные антитела в то же время сохраняют специфичность связывания и аффинность связывания антитела не являющегося человеком вида.

Термин "мультиспецифическое антитело" обозначает антитело, имеющее специфичность в отношении, по меньшей мере, двух различных, например, по меньшей мере, трех обычно неперекрывающихся эпитопов. Подобные эпитопы могут располагаться на одном или на разных антигенах-мишенях. Если эпитопы располагаются на разных мишенях, то такие мишени могут быть расположены на одной клетке или разных клетках или разных типах клеток.

Термин "биспецифическое антитело" обозначает антитело, имеющее специфичность в отношении двух различных обычно неперекрывающихся эпитопов. Подобные эпитопы могут располагаться на одной или на разных мишенях. Если эпитопы располагаются на разных мишенях, то такие мишени могут быть расположены на одной клетке или разных клетках или разных типах клеток.

Примеры различных классов биспецифических антител включают, но без ограничения, (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными CH3 доменами для форсирования гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двумя мишенями, где каждая из двух сторон молекулы содержит фрагмент Fab или часть фрагмента Fab, по меньшей мере, двух различных антител; (iii) слитые с IgG молекулы, где полноразмерные IgG антитела слиты с дополнительным фрагментом Fab или частями фрагмента Fab; (iv) слитые с Fc молекулы, где одноцепочечные Fv молекулы или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями; (v) слитые с Fab молекулы, где различные фрагменты Fab слиты друг с другом, слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диател и тяжелой цепи (например доменные антитела, Nanobodies®), где различные

одноцепочечные Fv молекулы или различные диатела или различные антитела с тяжелой цепью (например доменные антитела, Nanobodies®) слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем, слитой с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными CH3 доменами включают, но без ограничения, триомаб (Triomab®) (Trion Pharma/Fresenius Biotech), молекулы, полученные на основе способа типа выступы-во-впадины (Genentech), CrossMAb (Roche), и электростатически подобранные молекулы (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. *J. Biol. Chem.* 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), антитело с доменами, сконструированными посредством замены цепей (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonics (Merus, WO2013157953), FcΔAdp (Regeneron), биспецифический IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat), имеющие асимметрический каркас (Zymeworks/Merck), mAb-Fv (Xencor), бивалентные биспецифические антитела (Roche, WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двумя мишенями включают, но без ограничения, Ig с двумя мишенями (DT) (GSK/Domantis, WO2009058383), антитело два-в-одном (Genentech, Bostrom, et al 2009. *Science* 323, 1610–1614), поперечно сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star), Zybodies™ (Zyngenia, LaFleur et al. *MAbs.* 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), подходы на основе общей легкой цепи, κλ-тела (κλBodies) (NovImmune, WO2012023053) и CovX-тело® (CovX-body®) (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17,501–506).

Примеры слитых с IgG молекул включают, но без ограничения, Ig с двойным переменным доменом (DVD) (Abbott), антитела с двойными доменами с двумя головками (Unilever; Sanofi Aventis), IgG-подобные биспецифические (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. *Nat Biotechnol.* 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. *J Mol Biol.* 2009 Oct

30;393(3):672-92) и BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), HERCULES (Biogen Idec), продукт слияния scFv (Novartis), продукт слияния scFv (Changzhou Adam Biotech Inc) и TvAb (Roche).

Примеры слитых с Fc молекул включают, но без ограничения, продукты слияния ScFv/Fc (Academic Institution, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), полученные с помощью технологии перенацеливания на основе двойной аффинности (Fc-DARTTM) (MacroGenics) и Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine – China).

Примеры слитых с Fab биспецифических антител включают, но без ограничения, F(ab)2 (Medarex/AMGEN), антитела двойного действия или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), бивалентные биспецифические антитела (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech).

Примеры ScFv-, основанных на диателах и доменных антител включают, но без ограничения, биспецифическое антитело для связывания Т-клеток (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), полученные с помощью технологии перенацеливания на основе двойной аффинности (DARTTM) (MacroGenics), одноцепочечное антитело (Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), продукт связывания ScFv сывороточного альбумина человека (Merrimack, WO2010059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75), нанотела с двумя мишенями (dual targeting nanobodies®) (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010), включающие только тяжелую цепь антитела с двумя мишенями.

В контексте связывания антитела с антигеном термин "связывает" или "специфически связывает" обозначает связывание антитела с предварительно определенным антигеном или мишенью (например CD40 или V δ 2 человека), с которой обычно осуществляется связывание, с аффинностью,

соответствующей KD около 10^{-6} M или менее, например 10^{-7} M или менее, например около 10^{-8} M или менее, например около 10^{-9} M или менее, около 10^{-10} M или менее, или около 10^{-11} M или даже менее, например при определении с помощью проточной цитометрии, как описано в разделе Примеры. В качестве альтернативы заметные значения KD могут быть определены, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в инструменте VIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и связывающегося фрагмента или связывающейся молекулы в качестве аналита. Специфическое связывание означает, что антитело связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, соответствующей значению KD, которое, по меньшей мере, в десять раз ниже, например, по меньшей мере, в 100 раз ниже, например, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 100000 ниже, чем аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близкородственного антигена. Степень, с которой аффинность ниже, зависит от KD связывающегося фрагмента или связывающейся молекулы, так что когда KD связывающегося фрагмента или связывающейся молекулы является слишком низкой (то есть связывающийся фрагмент или связывающаяся молекула является высокоспецифичной), то степень, с которой аффинность в отношении антигена ниже, чем аффинность в отношении неспецифического антигена, может являться, по меньшей мере, 10000-кратной. Термин "KD" (M) в соответствии с используемым здесь значением обозначает константу равновесия диссоциации определенного взаимодействия между антигеном и связывающимся фрагментом или связывающейся молекулой.

В контексте настоящего изобретения термины "конкурирование" или "способный конкурировать" или "конкурирует" обозначают любое детектируемое значительное снижение предпочтения определенной

связывающейся молекулы (например CD40 антитела) в плане связывания с определенным партнером по связыванию (например CD40) в присутствии другой молекулы (например другого CD40 антитела), которая связывает партнер по связыванию. Как правило, конкурентное связывание означает, по меньшей мере, 25% снижение, например, по меньшей мере, 50% снижение, например, по меньшей мере, 75%, например, по меньшей мере, 90% снижение связывания, вызванное присутствием другой молекулы, например антитела, при определении, например, с помощью анализа ELISA или проточной цитометрии с использованием достаточных количеств данных двух или большего количества конкурирующих молекул, например антител. Дополнительные способы определения специфичности связывания на основе конкурентного ингибирования можно найти, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)). В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с тем же эпитопом на CD40, что и антитело V15 или V19, и/или с тем же эпитопом на V δ 2, что и антитело 5C8 или 6H4. Способы определения эпитопа связывающейся молекулы, такой как антитело, известны в данной области.

Термины "первый" и "второй" антигенсвязывающие участки при использовании здесь не обозначают их ориентацию/положение в антителе, то есть они не имеют значения в плане N- или C-конца. Термины "первый" и "второй" служат лишь для правильного и единообразного обозначения двух различных антигенсвязывающих участков в пунктах формулы изобретения и описании.

Термин "способная связывать TCR V γ 9V δ 2" означает, что связывающаяся молекула может связывать TCR V γ 9V δ 2, однако не исключает, что связывающаяся молекула связывается с одной из отдельных субъединиц при

отсутствии другой субъединицы, то есть с V γ 9 цепью самостоятельно или V δ 2 цепью самостоятельно. Например, антитело 5C8 представляет собой антитело, которое связывается с TCR V γ 9V δ 2, но также связывается с V δ 2 цепью, когда экспрессируется только V δ 2 цепь.

Термин "% идентичности последовательности" при использовании здесь обозначает количество идентичных нуклеотидных или аминокислотных положений, являющихся общими для различных последовательностей (то есть % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений \times 100), учитывая количество промежутков и длину каждого промежутка, которые должны быть добавлены для оптимального выравнивания. Процентная идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может быть определена, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который был встроен в программу ALIGN (версия 2.0), с помощью таблицы весов остатков PAM120, штрафа за промежуток длиной 12 и штрафа за промежуток длиной 4.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения

Как описано выше, в первом главном аспекте изобретение предусматривает мультиспецифическое антитело, включающее первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связывать рецептор V γ 9V δ 2 Т-клеток человека.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело. В другом варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело. В другом варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело. В дополнительном варианте осуществления как первый антигенсвязывающий участок, так и второй антигенсвязывающий участок представляют собой

однодоменные антитела.

В одном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок являются ковалентно связанными друг с другом через пептидный линкер, например линкер, имеющий длину от 1 до 20 аминокислот, например от 1 до 10 аминокислот, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 аминокислот. В одном варианте осуществления пептидный линкер включает или состоит из последовательности GGGGS, указанной в SEQ ID NO: 21.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела первый антигенсвязывающий участок расположен на N-конце второго антигенсвязывающего участка.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело моновалентно связывается с CD40 и моновалентно связывается с рецептором V γ 9V δ 2 Т-клеток человека.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению мультиспецифическое антитело не является агонистом CD40 человека. Агонизм CD40 может быть определен путем определения способности антитела повышать уровень экспрессии CD80, CD86 и/или CD95 на экспрессирующих CD40 клетках, например первичных клетках пациента с ХЛЛ. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 8. В одном варианте осуществления экспрессия CD80 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В другом варианте осуществления экспрессия CD86 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В дополнительном варианте осуществления экспрессия CD95 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии

антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению мультиспецифическое антитело представляет собой антагонист CD40 человека. Антагонистический эффект на CD40 может быть определен, например, с помощью тестирования способности антитела ингибировать активацию CD40 с помощью CD40L на экспрессирующих CD40 клетках, например первичных клетках от пациента с ХЛЛ. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 9. В одном варианте осуществления экспрессия CD80 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В одном варианте осуществления экспрессия CD86 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В одном варианте осуществления экспрессия CD95 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно сенсibiliзировать экспрессирующие CD40 человека клетки, например первичные клетки пациента с ХЛЛ, в отношении венетоклакса. Сенсibiliзация первичных клеток пациента с ХЛЛ в отношении венетоклакса с помощью антитела может быть проанализирована путем определения жизнеспособности первичных клеток в присутствии различных концентраций венетоклакса при присутствии или отсутствии антитела. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 10. В одном варианте осуществления гибель определенных клеток при концентрации венетоклакса 100 нМ является, по меньшей мере, на 10%,

например, по меньшей мере, на 20% большей в присутствии антитела по сравнению с контролем, в рамках которого антитело отсутствует, при анализе как описано в Примере 10.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело связывает CD40⁺ СИИ клетки с KD ниже 200 нМ, например ниже 100 нМ, например ниже 50 нМ, например ниже 20 нМ, например от 5 до 15 нМ, например при тестировании как описано в Примере 7.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело конкурирует (то есть способно конкурировать) за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

В дополнительном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок включает:

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6.

В одном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок является гуманизированным. В другом варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок включает или состоит из:

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или

последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или

- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:14.

Как описано выше, мультиспецифическое антитело по изобретению включает второй антигенсвязывающий участок, способный связывать рецептор V γ 9V δ 2 Т-клеток человека. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки человека. Активация V γ 9V δ 2 Т-клеток может быть измерена с помощью профилей экспрессии генов и/или профилей экспрессии (поверхностных) маркеров (например маркеров активации, таких как CD25, CD69, или CD107a) и/или профилей секреторного белка (например цитокинов или хемокинов). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело способно индуцировать активацию (например повышение CD69 и/или экспрессию CD25), что приводит к дегрануляции, отмечаемой на основе повышения экспрессии CD107a, см. Пример 11, и продуцированию цитокинов (например TNF α , IFN γ) V γ 9V δ 2 Т-клетками. Предпочтительно мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно повышать количество клеток, являющихся положительными в плане CD107a, по меньшей мере, 1,5-кратно, например, по меньшей мере, 2-кратно, например, по меньшей мере, 5-кратно.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель экспрессирующих CD40 человека

клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом. Гибель экспрессирующих CD40 человека клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом может быть определена, например, как описано в Примере 12. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать гибель определенных клеток более чем на 25%, например более чем на 30%, при концентрации 10 пМ, как определено на основе анализа, описанного в Примере 12. В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело при анализе как описано в Примере 12 имеет половину максимальной эффективной концентрации в диапазоне от 1 до 20 пМ, например от 5 до 10 пМ.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель экспрессирующих CD40 клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом, которые были стимулированы CD40L. Гибель стимулированных CD40L экспрессирующих CD40 клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом может быть определена, например, как описано в Примере 15. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать гибель определенных клеток более чем на 25%, например более чем на 50%, при концентрации 10 нМ, как определено на основе анализа, описанного в Примере 15.

В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно опосредовать лизис экспрессирующих CD40 человека клеток от пациента с множественной миеломой. Лизис экспрессирующих CD40 человека клеток от пациента с множественной миеломой может быть определен, например, как описано в Примере 18. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать лизис определенных клеток более чем на 25%, например более чем на 40%, при концентрации 10 нМ, как определено на основе анализа, описанного в Примере 18.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению мультиспецифическое антитело способно связываться с V δ 2 человека. V δ 2 представляет собой дельта-цепь TCR V γ 9V δ 2. В другом варианте осуществления мультиспецифическое антитело способно связываться с V γ 9 человека. V γ 9 представляет собой гамма-цепь TCR V γ 9V δ 2. Несколько подобных антител, которые связываются с V δ 2 или V γ 9, были описаны в WO2015156673, при этом их антигенсвязывающие участки, по меньшей мере, их CDR последовательности, могут быть встроены в мультиспецифическое антитело по изобретению. Другие примеры антител, из которых может быть получен связывающийся с TCR V γ 9V δ 2 участок, представляют собой TCR V γ 9 антитело 7A5 (ThermoFisher) (Oberge et al. (2014) Cancer Res 74:1349) и антитела B1.1 (ThermoFisher) и 5A6.E9 (ATCC HB 9772), оба из которых описаны у Neuman et al. (2016) J Med Prim 45:139.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело связывает V γ 9V δ 2⁺ T-клетки с KD ниже 100 нМ, например ниже 50 нМ, например ниже 20 нМ, например ниже 10 нМ, например от 0,5 до 2,5 нМ, например при тестировании как описано в Примере 7.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание V δ 2 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или конкурирует за связывание V δ 2 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:18. В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на V δ 2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или связывается с тем же эпитопом на V δ 2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:18.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:7, последовательность

VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:8, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:9, или включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:12.

В другом варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:12.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению второй антигенсвязывающий участок является гуманизированным.

В дополнительном варианте осуществления второй антигенсвязывающий участок включает или состоит из:

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или
- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или
- последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34.

В одном варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению первый антигенсвязывающий участок включает

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и

последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6,
а второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:7, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:8, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:9.

В другом варианте осуществления мультиспецифического антитела по изобретению первый антигенсвязывающий участок включает

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6,

а второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:12.

Как описано выше, в дополнительном главном аспекте изобретение относится к антителу, включающему первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, при этом антитело конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

В одном варианте осуществления антитело связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

В дополнительном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок включает:

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6.

В другом дополнительном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок включает или состоит из:

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или
- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:14.

В дополнительном варианте осуществления первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело. В другом варианте осуществления антитело представляет собой моноспецифическое антитело, например моновалентное антитело. В дополнительном варианте осуществления антитело включает второй антигенсвязывающий участок, который связывается с антигеном, который не является CD40 или V δ 2 человека.

В дополнительном варианте осуществления антитело не является агонистом CD40 человека. Как было указано, агонизм CD40 может быть определен путем определения способности антитела повышать уровень

экспрессии CD80, CD86 и/или CD95 на экспрессирующих CD40 клетках, например первичных клетках пациента с ХЛЛ. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 4. В одном варианте осуществления экспрессия CD80 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В другом варианте осуществления экспрессия CD86 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В дополнительном варианте осуществления экспрессия CD95 на первичных клетках пациента с ХЛЛ повышается менее чем на 10%, например менее чем на 5%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует.

В дополнительном варианте осуществления антитело представляет собой антагонист CD40 человека. Как было указано, антагонистический эффект на CD40 может быть определен, например, с помощью тестирования способности антитела ингибировать активацию CD40 с помощью CD40L на экспрессирующих CD40 клетках, например первичных клетках от пациента с ХЛЛ. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 5. В одном варианте осуществления экспрессия CD80 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В одном варианте осуществления экспрессия CD86 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует. В одном варианте осуществления экспрессия CD95 на первичных клетках пациента с ХЛЛ в присутствии достаточных концентраций CD40L повышается менее чем на 20%, например

менее чем на 10%, в присутствии антитела по сравнению с контролем, когда антитело отсутствует.

В дополнительном варианте осуществления антитело способно сенсibilизировать экспрессирующие CD40 человека клетки, например первичные клетки пациента с ХЛЛ, в отношении венетоклакса. Сенсibilизация первичных клеток пациента с ХЛЛ в отношении венетоклакса с помощью антитела может быть проанализирована путем определения жизнеспособности первичных клеток в присутствии различных концентраций венетоклакса при присутствии или отсутствии антитела. Подобный анализ может быть реализован как описано в Примере 10. В одном варианте осуществления гибель определенных клеток при концентрации венетоклакса 100 нМ является, по меньшей мере, на 10%, например, по меньшей мере, на 20% большей в присутствии антитела по сравнению с контролем, в рамках которого антитело отсутствует, при анализе как описано в Примере 10.

Таблица 1: Перечень последовательностей.

SEQ ID.	Код	Описание	Последовательность
1	V19	CDR1	RSAMG
2	V19	CDR2	AIGTRGGSTKYADSVKG
3	V19	CDR3	RGPGYPSAAIFQDEYHY
4	V15	CDR1	SDTMG
5	V15	CDR2	SISSRGVREYADSVKG
6	V15	CDR3	GALGLPGYRPYNN
7	5C8	CDR1	NYAMG
8	5C8	CDR2	AISWGGSTSYADSVKG
9	5C8	CDR3	QFSGADYGFGR LGIRGYEYDY
10	6H4	CDR1	NYGMG

11	6H4	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG
12	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
13	V19	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFGRSAMGWFRQAPGKEREFVAAIGT RGGSTKYADSVKGRFTISTDNASNTVY LQMDSLKPEDTAVYRCAVRGPGYPSAAI FQDEYHYWGQGTQVTVSS
14	V15	VHH	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVTS AFSSDTMGWFRQAPGKQRELVASISSR GVREYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLQPEDTAVYYCNRGALGLPGYRPY NNWGQGTQVTVSS
15	V19t	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFGRSAMGWFRQAPGKEREFVAAIGT RGGSTKYADSVKGRFTISTDNASNTVY LQMDSLKPEDTAVYRCAVRGPGYPSAAI FQDEYHYWGQGTQVTVSSGLEGHSDH MEQKLISEEDLNRI SDHHHHHH
16	V15t	VHH	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVTS AFSSDTMGWFRQAPGKQRELVASISSR GVREYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLQPEDTAVYYCNRGALGLPGYRPY NNWGQGTQVTVSSGLEGHSDHMEQKL ISEEDLNRI SDHHHHHH
17	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNANTVYL QMNSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYGF RLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
18	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR PFSNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISW SGGSTDYADSVKGRFTISRDNANTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYY PSDDYDYWGQGTQVTVSS
19	V19- 5C8t	Биспецифическая связывающаяся молекула	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFGRSAMGWFRQAPGKEREFVAAIGT RGGSTKYADSVKGRFTISTDNASNTVY

			LQMDSLKPEDTAVYRCAVRGPGYPSAAI FQDEYHYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFS NYAMGWFRQAPGKEREVAAISWSSG STSYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYGFGR LG IRGYEYDYWGQGTQVTVSSGLEGHSD HMEQKLISEEDLNRISDHHHHHH
20	V15-5C8t	Биспецифическая связывающаяся молекула	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVTS GS AFSSDTMGWFRQAPGKQRELVASISSR GVREYADSVKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLQPEDTAVYYCNRGALGLPGYR PY NNWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSNYAMG WFRQAPGKEREVAAISWSSGGSTSYAD SVKGRFTISRDNANTVYLQMNSPKPE DTAIYYCAAQFSGADYGFGR LGIRGYEY DYWGQGTQVTVSSGLEGHSDHMEQKL ISEEDLNRISDHHHHHH
21	GS линкер	Линкер	GGGGS
22	V19S76Kt	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFGRSANGWFRQAPGKEREVAAIGT RGGSTKYADSVKGRFTISTDNANTVY LQMDSLKPEDTAVYRCAVRGPGYPSAAI FQDEYHYWGQGTQVTVSSGLEGHSDH MEQKLISEEDLNRISDHHHHHH
23	V19S76K- 5C8	Биспецифическая связывающаяся молекула	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RTFGRSANGWFRQAPGKEREVAAIGT RGGSTKYADSVKGRFTISTDNANTVY LQMDSLKPEDTAVYRCAVRGPGYPSAAI FQDEYHYWGQGTQVTVSSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFS NYAMGWFRQAPGKEREVAAISWSSG STSYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYGFGR LG IRGYEYDYWGQGTQVTVSS
24	CD40		MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACRE

	человека		KQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTE TECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYC DPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWH CTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGV SDTICEPCVGGFFSNVSSAFEKCHPWTS CETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLR ALVVIPIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPTN KAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQ ETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
25	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKEREFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
26	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKEREFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGTTLVTVSS
27	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKLEFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGTTLVTVSS
28	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFRQAPGKEREFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGTTLVTVSS
29	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFRQAPGKEREFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGTTLVTVSS
30	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFRQAPGKEREFSVAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG

			RLGIRGYEYDYWGQGLTVTVSS
31	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWRQAPGKEREFVSAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGLTVTVSS
32	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWRQAPGKEREFVSAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGLTVTVSS
33	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFREAPGKEREFVSAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGLTVTVSS
34	Вариант 5C8	Гуманизированная последовательность	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFREAPGKEREFVSAISWS GGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYWGQGLTVTVSS
35	V12	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGL VFKRYSMNWYRQPPGQQRGLVASISDS GVSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCNMHTFWGQGTQ VTVSS
36	V12t	VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGL VFKRYSMNWYRQPPGQQRGLVASISDS GVSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCNMHTFWGQGTQ VTVSSGLEGHS DHMEQKLISEEDLNRI SDHHHHHH
37	V12-5C8t	Биспецифическая связывающаяся молекула	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGL VFKRYSMNWYRQPPGQQRGLVASISDS GVSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCNMHTFWGQGTQ VTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAASGRPFSNYAMGWRQAPGK

			<p>EREFVAAISWSGGSTSYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYVLQMNSPKPEDTAIYYCAA QFSGADYGFGRLLGIRGYEYDYWGQGT QVTVSSGLEGHSDHMEQKLISEEDLNR ISDHHHHHH</p>
--	--	--	--

Антитела по изобретению обычно получают рекомбинантными способами, например путем экспрессии конструкторов нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, в подходящих клетках-хозяевах с дальнейшим выделением полученного рекомбинантного антитела из клеточной культуры. Конструкторы нуклеиновых кислот могут быть получены с помощью стандартных молекулярных биологических способов, которые хорошо известны в данной области. Конструкторы обычно вводят в клетку-хозяин с помощью вектора экспрессии. Подходящие конструкторы нуклеиновых кислот и векторы экспрессии известны в данной области. Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, хорошо известны в данной области и включают клетки CHO, HEK-293, Expi293F, PER-C6, NS/O и Sp2/O.

Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к конструктору нуклеиновых кислот, кодирующих антитело по изобретению, например мультиспецифическое антитело по изобретению. В одном варианте осуществления конструктор представляет собой конструктор ДНК. В другом варианте осуществления конструктор представляет собой конструктор РНК.

В дополнительном аспекте изобретение относится к вектору экспрессии, включающему конструктор нуклеиновых кислот, кодирующих антитело по изобретению, например мультиспецифическое антитело по изобретению.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, включающей конструктор нуклеиновых кислот, кодирующих антитело по изобретению, например мультиспецифическое антитело по изобретению или вектор экспрессии, включающий конструктор нуклеиновых кислот, кодирующих антитело по изобретению, например мультиспецифическое антитело по

изобретению.

в дополнительном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей антитело по изобретению, например мультиспецифическое антитело по изобретению, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Антитела могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми наполнителями в соответствии со стандартными способами, например описанными в (Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012 June, ISBN 9780857110275). Фармацевтически приемлемый наполнитель, а также другие носители, разбавители или адъюванты должны являться подходящими для антител и выбранного способа введения. То, что наполнители и другие компоненты фармацевтических композиций являются подходящими, определяют на основе отсутствия значительного негативного влияния на требуемые биологические свойства выбранного антитела или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например менее чем значительного влияния (10% или менее относительное ингибирование, 5% или менее относительное ингибирование и так далее) при связывании антигена). Фармацевтическая композиция может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например неинионный детергент, например Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Дополнительные фармацевтически приемлемые наполнители включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, противомикробные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и задерживающие всасывание агенты, и им подобные, которые являются физиологически совместимыми с антителом по настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте изобретение относится к антителам по

изобретению, как описано здесь, например мультиспецифическим антителам по изобретению, как описано здесь, для применения в качестве лекарства.

Мультиспецифическое антитело по изобретению обеспечивает возможность создания микросреды, которая является полезной в плане гибели опухолевых клеток, в частности CD40-положительных опухолевых клеток, с помощью V γ 9V δ 2 T-клеток.

Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к антителам по изобретению, как определено здесь, например мультиспецифическим антителам по изобретению, как определено здесь, для применения при лечении рака, например хронического лимфолейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, ходжкинской лимфомы, фолликулярной лимфомы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака простаты, В-клеточной лимфомы/лейкемии, лимфомы Беркитта или острого В-лимфобластного лейкоза. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителам по изобретению, как описано здесь, например мультиспецифическим антителам по изобретению, как описано здесь, для применения при лечении хронического лимфолейкоза. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителам по изобретению, как описано здесь, например мультиспецифическим антителам по изобретению, как описано здесь, для применения при лечении множественной миеломы.

В другом варианте осуществления антитела по изобретению применяются при лечении аутоиммунных заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в качестве монотерапии. Однако антитела по настоящему изобретению могут быть также введены в рамках комбинированной терапии, то есть могут быть объединены с другими терапевтическими агентами, являющимися релевантными в отношении подвергаемого лечению заболевания или состояния. В одном

варианте осуществления антитело применяется в комбинации с блокатором Vcl-2, например венетоклаксом.

Аналогичным образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение антитела по изобретению, например мультиспецифического антитела по изобретению, нуждающемуся в этом субъекту, представляющему собой человека. В одном варианте осуществления заболевание представляет собой рак.

Термин "лечение" или "лечащий" обозначает введение эффективного количества антитела по настоящему изобретению с целью облегчения, улучшения, остановки, устранения (излечения) или предотвращения симптомов или стадий заболевания. Термин "эффективное количество" обозначает количество, являющееся эффективным в рамках необходимых дозировок и периодов времени для достижения требуемого терапевтического эффекта. Эффективное количество полипептида, например антитела, может варьироваться в соответствии с такими факторами как стадия заболевания, возраст, пол и вес субъекта, а также способностью антитела вызывать желаемый ответ у субъекта. Эффективное количество также является таким количеством, при котором любые токсические или негативные эффекты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Пример неограничивающего диапазона эффективного количества антитела по настоящему изобретению представляет собой от около 0,1 до 100 мг/кг, например от около 0,1 до 50 мг/кг, например от около 0,1 до 20 мг/кг, например от около 0,1 до 10 мг/кг, например около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5, или около 8 мг/кг. Введение может осуществляться путем любого подходящего способа, но обычно будет являться парентеральным, например внутривенным, внутримышечным или подкожным.

Примеры

Пример 1: получение VHH

Введение

Получали моновалентные VHH, которые специфически связываются с CD40 человека. Данные VHH затем использовали для получения биспецифических VHH против CD40 и TCR V γ 9V δ 2.

Материалы и способы

Получение моновалентных VHH, специфичных в отношении TCR V γ 9V δ 2

Ранее получали специфическое в отношении TCR V γ 9V δ 2 VHH 5C8 (SEQ ID NO:17), связывающееся с V δ 2 цепью рецептора V γ 9V δ 2 Т-клеток (de Bruin et al. (2016), Clin Immunol 169:128-138) (WO2015156673).

Получение моновалентных CD40-специфических VHH

Иммунизация лам

CD40-специфические VHH получали как описано ранее (de Bruin et al. (2016), Clin Immunol 169:128-138, Lameris et al. (2016), Immunology 149(1)111-21). Двух лам (Lama glama) иммунизировали шесть раз с помощью $50 \cdot 10^6$ MUTZ-3 DC клеток с однонедельным интервалом (см., например, Masterson (2002) Blood 100:701).

Конструирование фаговой библиотеки VHH

Выделяли РНК из лимфоцитов периферической крови, полученных спустя 1 неделю после последней иммунизации, транскрибировали в кДНК и использовали для амплификации генов, кодирующих тяжелую цепь Ig (Roovers et al. (2007) Cancer Immunol Immunother 56(3):303-317). Фаговые библиотеки конструировали путем лигирования кодирующих VHH генов в фагмидный вектор pUR8100, содержащий кодирующий Мус- и His6-метку фрагмент, и последующей трансформации в *E. coli* TG1 для дисплея на нитчатых бактериофагах.

Обогащение и отбор CD40-специфических VHH

Для обогащения фагов, отображающих CD40-специфические VHH, были осуществлены множественные этапы отбора. Планшеты покрывали меченым

IgG1-Fc CD40 человека (71174, BPS Bioscience, San Diego, CA, USA). Фаги блокировали PBS, содержащим 1% альбумин коровьей сыворотки, 1% молока, 0,05% Твина-20 и IgG человека (0,625 мг/мл), и затем оставляли для связывания с покрытыми CD40 планшетами. Элюированные фаги использовали для инфицирования экспоненциально растущих *E. coli* TG1.

Спустя два подобных этапа осуществляли скрининг на основе ELISA для отбора на основе связывания CD40 человека, но не Ig человека. Для данной цели планшеты покрывали меченым IgG1-Fc CD40 человека или Ig человека и инкубировали с периплазматическими экстрактами из трансформированных TG1. Связанные экстракты детектировали путем последовательного инкубирования с полученной от мыши меткой против Мус (05-274, Merck, Kenilworth, NJ, USA) и конъюгированными с HRP полученными от кроликов антителами против IgG мыши. Анализ ДНК последовательности выбранных клонов демонстрировал три различные последовательности CD40-специфических VHH. Кодированные аминокислотные последовательности показаны в перечне последовательностей. В SEQ ID NO:13 показана последовательность V19 VHH, в SEQ ID NO:14 показана последовательность V15 VHH, а в SEQ ID NO:35 показана последовательность V12 VHH.

Получение и очистка VHH

Сегменты генов, кодирующие три выбранных моновалентных VHH и Мус- и His₆-метку, повторно клонировали в вектор pсDNA5, который использовали для трансфекции HEK293Т клеток. Белок VHH выделяли из супернатанта HEK293Т путем последовательной эксклюзии на основе размера, отбора на основе Ni с использованием His-метки, и элюирования на основе имидазола с использованием быстрой жидкостной хроматографии белков. Три различных VHH белка были обозначены как V19t (SEQ ID NO:15), V15t (SEQ ID NO:16) и V12t (SEQ ID NO:36), где "t" обозначает, что VHH содержит C-концевую Мус- и His₆-метку. Целостность и чистоту VHH подтверждали на основе окрашивания кумасси синим в SDS-PAGE гелях и вестерн-блоттинга с

использованием антител против Мус-метки. VHH подвергали количественному анализу с использованием спектрофотометра Nanodrop.

Получение биспецифических конструкторов

Для получения конструкторов биспецифических VHH V19-5C8t (SEQ ID NO:19), V15-5C8t (SEQ ID NO:20) и V12-5C8t (SEQ ID NO:37) VHH против TCR V δ 2 (С-конец) (SEQ ID NO:17) соединяли с VHH против CD40 (N-конец) с помощью Gly₄Ser линкера (SEQ ID NO:21). Биспецифические VHH, содержащие Мус- и His₆-метку, получали путем трансфекции HEK293Т, как описано выше. Белок VHH выделяли из супернатанта с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами на смоле Talon (635503, Clontech, Mountain View, CA, USA) и далее элюирования на основе имидазола.

Получение V19S76K-5C8

Идентифицировали предполагаемый участок гликозилирования в каркасном участке 3 V19t VHH, после чего получали и выделяли новое VHH (V19S76Kt) (SEQ ID NO:22), в котором соответствующий серин (положение 76) был заменен на лизин.

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8t конструировали как описано выше. С помощью UPE (Utrecht, the Netherlands) получали не имеющее метки V19S76K (SEQ ID NO:23), как описано выше.

Пример 2: моновалентное VHH связывается с CD40-трансфицированными клетками

Введение

Анализировали способность моновалентного VHH против CD40 специфично связываться с экспрессирующими CD40 клетками.

Материалы и способы

Линии клеток

Линию эмбриональных клеток почки HEK293Т дикого типа (WT) или трансфицированных CD40 человека выращивали в модифицированной по

способу Дульбекко среде Игла (41965-039, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (F7524, Merck, Kenilworth, NJ, USA), 200 мМ L-глутамина (25030-123, Thermo Fisher Scientific), 0,05 мМ β-меркаптоэтанола (M6250, Merck) и 10000 МЕ/мл пенициллина/стрептомицина (15140-122, Thermo Fisher Scientific), далее обозначаемых как полная среда DMEM.

Связывание VHH

Экспрессию CD40 на CD40-трансфицированных клетках подтверждали путем инкубирования с PE-конъюгированным антителом против CD40 (IM1936U, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) в течение 20 минут при 4°C. Для анализа связывания VHH клетки инкубировали с 100 нМ V15t, 100 нМ V19t или контрольной средой в течение 30 минут при 37°C. Связанное VHH детектировали путем последовательного инкубирования с антителами мыши против Мус-метки (05-274, Merck) и конъюгированными с AF488 антителами козы против мыши (A-11001, Thermo Fisher Scientific) в течение 20 минут при 4°C.

Проточная цитометрия

Образцы подвергали измерению на цитометре FACSCanto (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) и анализировали с помощью Flowjo MacV10.

Результаты

Использовали CD-трансфицированные и относящиеся к дикому типу HEK293T клетки для тестирования связывания моновалентного VHH против CD40. Подтверждали экспрессию CD40 на CD40-трансфицированных клетках (Фиг.1А). V19t, V15t и V12t связывались с CD40-экспрессирующими клетками, что демонстрировалось на основе детектирования Мус-метки (Фиг.1В). Напротив, VHH против CD40 не связывались с CD40-отрицательными HEK293T клетками дикого типа.

Более того, мутация участка гликозилирования в V19t (S76K мутация) не нарушала способность связываться с CD40, см. Таблицу 1.

Таблица: связывание V19t и V19S76Kt с CD40-экспрессирующими клетками

Концентрация VНН	V19t	V19S76Kt
0 пМ	648	648
1 пМ	5031	4790
10 пМ	4938	4949
100 пМ	5538	5502
1 нМ	6783	7906
10 нМ	9101	9283
100 нМ	16175	17062

Таблица 1: Мутация участка гликозилирования в V19t не нарушает способность связываться с CD40. CD40-трансфицированные HEK293T клетки инкубировали с указанными концентрациями V19t или V19S76Kt и далее детектировали Мус-метку с помощью проточной цитометрии. Показана средняя геометрическая интенсивность флуоресценции, полученная в рамках 2 экспериментов.

Заключение

VНН против CD40, V19t и V15t, специфично связываются с экспрессируемым на клеточной поверхности CD40, при этом аффинность связывания V19t сохранялась в V19S76Kt.

Пример 3: моновалентное VНН связывается с клетками первичного ХЛЛ

Введение

Клетки первичного хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) экспрессируют CD40 на клеточной поверхности. Таким образом, было проанализировано связывание VНН против CD40 и клеток первичного ХЛЛ.

Материалы и способы

Материал пациентов

Мононуклеарные клетки периферической крови (ПК) (МКПК, $\geq 95\%$ CD5+CD19+) выделяли из образцов ПК от не получавших лечение пациентов с ХЛЛ и замораживали, как описано ранее (Hallaert et al. (2008), Blood 112(13):5141-9). Исследование было одобрено комитетом по медицинской этике медицинского центра университета Амстердама (Amsterdam UMC). Было получено письменное информированное согласие от всех субъектов. Размороженные клетки хранили в модифицированной по способу Исков среде Дульбекко (IMDM; 12440-053, Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (F7524, Merck), 200 мМ L-глутамин (25030-123, Thermo Fisher Scientific), 0,05 мМ β -меркаптоэтанола (M6250, Merck) и 10000 МЕ/мл пенициллина/стрептомицина (15140-122, Thermo Fisher Scientific), далее обозначаемых как полная среда IMDM.

Связывание VHN и проточная цитометрия

Подтверждали экспрессию CD40 на клетках первичного ХЛЛ и анализировали как описано в Примере 2.

Результаты

Клетки первичного ХЛЛ равномерно экспрессировали CD40 (Фиг.2А). VHN против CD40 явно связывались с клетками первичного ХЛЛ во всех протестированных образцах, хотя V15t и V19t имели бóльшую интенсивность связывания, чем V12t (Фиг.2В).

Заключение

VHN против CD40 связываются с клетками первичного ХЛЛ.

Пример 4: моновалентное VHN не является агонистом CD40

Введение

Связывание CD40 с родственным ему лигандом CD40L может приводить к различным биологическим ответам. Эффекты, индуцированные стимулированием CD40 в клетках первичного ХЛЛ, включают клеточный рост

и повышенную экспрессию костимулирующих молекул (то есть CD86) и Fas рецептора (CD95). Способность VHH против CD40 индуцировать стимулирование CD40 было протестировано на клетках первичного ХЛЛ.

Материалы и способы

Материал пациентов

Получали МКПК ($\geq 90\%$ CD5⁺CD19⁺) от не получавших лечение пациентов с ХЛЛ и замораживали как описано в Примере 3. Размороженные клетки хранили в полной среде IMDM.

Агонистическая активность

Для анализа наличия агонистических эффектов при связывании VHH с CD40 МКПК первичного ХЛЛ культивировали в течение 48 часов в присутствии VHH, контрольной среды или рекомбинантного мультимерного CD40 лиганда (rmCD40L; 100 нг/мл, Biosconnect).

Проточная цитометрия

Спустя 48 часов клетки собирали, промывали и инкубировали с конъюгированными с AF700 антителами против CD19 (557921), конъюгированными с FITC антителами против CD80 (6109965), конъюгированными с APC антителами против CD86 (555660, все от BD Biosciences), конъюгированными с PE антителами против CD5 (12-0059-42, Thermo Fisher Scientific) и конъюгированными с PEcy7 антителами против CD95 (305621, Biolegend, San Diego, CA, USA) в течение 20 минут при 4°C. В качестве альтернативы, спустя 48 часов клетки собирали и измеряли жизнеспособность с помощью Mitotracker Orange (25-минутное инкубирование при 37°C) и To-pro-3 (10-минутное инкубирование при комнатной температуре; оба от Thermo Fisher Scientific). Образцы подвергали измерению на цитометре FACSCanto (BD Biosciences) и анализировали с помощью Flowjo MacV10.

Результаты

gmCD40L эффективно индуцировал стимуляцию CD40, что демонстрируется на основе повышения жизнеспособности и экспрессии CD86 и CD95 (Фиг.3A-C). VHH против CD40, V19t, V15t и V12t, с другой стороны, не индуцировали какого-либо из данных эффектов при различных протестированных здесь концентрациях.

Заключение

Моновалентные VHH против CD40 не являются агонистами CD40.

Пример 5: моновалентное VHH антагонизирует стимуляцию CD40

Введение

Связывание CD40L может индуцировать стимуляцию CD40. Поскольку как CD40L, так VHH против CD40 могут связывать CD40, было проанализировано, может ли VHH против CD40 предотвращать индуцируемое CD40L стимуляцию CD40.

Материалы и способы

Материал пациентов

Получали МКПК ($\geq 90\%$ CD5⁺CD19⁺) от не получавших лечение пациентов с ХЛЛ и замораживали как описано в Примере 2. Размороженные клетки хранили в полной среде IMDM.

Антагонистическая активность

Для тестирования того, антагонизирует ли VHH стимуляцию CD40 МКПК первичного ХЛЛ предварительно инкубировали с VHH или контрольной средой в течение 30 минут при 37°C и далее культивировали в течение 48 часов в присутствии gmCD40L (100 нг/мл).

Проточная цитометрия

Спустя 48 часов клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 4.

Результаты

rmCD40L эффективно индуцировал стимуляцию CD40, что демонстрируется на основе повышения жизнеспособности и экспрессии CD86 и CD95 (Фиг.4А-С). Предварительное инкубирование с V15t или V19t предотвращало стимуляцию CD40 дозозависимым образом. Однако V12t не блокировал CD40L-индуцированные эффекты.

Заключение

Моновалентные VHH V15t и V19t против CD40 антагонизируют стимуляцию CD40.

Пример 6: Биспецифическое VHH антитело связывается с CD40-трансфицированными клетками

Введение

Анализировали способность конструктора биспецифического VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 специфично связываться с экспрессирующими CD40 клетками.

Материалы и способы

Получение VHH

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 получали как описано в Примере 1.

Линия клеток

Линию эмбриональных клеток почки HEK293T дикого типа (WT) или трансфицированных CD40 человека выращивали в полной среде DMEM.

Связывание VHH

Для анализа связывания VHH клетки инкубировали с V19S76K-5C8 (1 мкМ) или контрольной средой в течение 30 минут при 37°C. Связанные VHH детектировали путем инкубирования с конъюгированными с FITC антителами козы против тяжелой и легкой цепи IgG ламы (A160-100F, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) в течение 20 минут при 4°C.

Проточная цитометрия

Спустя 48 часов клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 2.

Результаты

V19S76K-5C8 связывается с экспрессирующими CD40 HEK293T клетками, но не с CD40-отрицательными HEK293T клетками дикого типа (Фиг.5)

Заключение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 специфично связывается с экспрессируемым на клеточной поверхности CD40.

Пример 7: Биспецифическое VHH антитело связывается с CD40⁺ и V γ 9V δ 2⁺ клетками

Введение

Анализировали способность биспецифического VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 связываться с CD40⁺ и V γ 9V δ 2⁺ клетками.

Материалы и способы

Линии клеток

Полученную на основе ХЛЛ линию клеток СИИ выращивали в полной среде IMDM. Очищенные линии V γ 9V δ 2 Т-клеток получали, как описано ранее (de Bruin et al. (2017), Oncoimmunology 7(1): e1375641). Кратко, V δ 2⁺ Т-клетки выделяли из МКПК здорового донора (ЗД) с помощью конъюгированного с FITC TCR против V δ 2 (2257030, Sony, San Jose, CA) в комбинации с микрошариками против IgG мыши (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) и культивировали еженедельно с облученной фидерной смесью, состоящей из МКПК от 2 ЗД, JY клеток, IL-7 (10 МЕ/мл), IL-15 (10 нг/мл, R&D Systems) и фитогемагглютинаина (PHA; R30852801, Thermo Fisher Scientific). Чистоту V γ 9V δ 2 Т-клеток поддерживали на уровне >90%.

Связывание VHH

Связывание VHH анализировали как описано в Примере 6.

Проточная цитометрия

Спустя 48 часов клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 2.

Результаты

V19S76K-5C8 связывается с V γ 9V δ 2⁺ клетками со значением KD 1,2 нМ (Фиг.6А и В). Аналогичным образом, V19S76K-5C8 связывается с CD40⁺ СИИ клетками со значением KD 10,9 нМ, что было определено с помощью проточной цитометрии (Фиг.6С и D).

Заключение

Биспецифическое VНН V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 связывается как с CD40⁺, так и V γ 9V δ 2⁺ клетками.

Пример 8: Биспецифическое VНН антитело не является агонистом CD40

Введение

Моновалентное VНН против CD40 V19t не индуцирует стимулирование CD40. С помощью клеток первичного ХЛЛ анализировали, отсутствует ли стимулирование CD40 также когда V19 встроен в биспецифическое VНН V19S76K-5C8.

Материалы и способы

Материал пациентов, агонистическая активность и проточная цитометрия

Для анализа наличия агонистических эффектов при связывании VНН МКПК первичного ХЛЛ культивировали с указанными концентрациями V19S76K-5C8, контрольной средой или r α CD40L в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 4.

Результаты

r α CD40L эффективно индуцировал стимулирование CD40, что демонстрируется на основе повышения экспрессии CD80, CD86 и CD95 (Фиг.7А-С). Напротив, ни одна из протестированных концентраций V19S76K-5C8 не повышала экспрессию CD80, CD86 или CD95.

Заключение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 не является агонистом CD40.

Пример 9: Биспецифическое VHH антитело антагонизирует стимулирование CD40

Введение

Моновалентное VHH против CD40 V19t предотвращает эффекты, индуцированные CD40L-индуцированным стимулированием CD40. С помощью клеток первичного ХЛЛ анализировали, сохраняется ли антагонистическая активность CD40 при биспецифическом формате V19S76K-5C8.

Материалы и способы

Материалы пациентов, антагонистическая активность и проточная цитометрия

Для анализа наличия антагонистических эффектов при связывании VHH МКПК первичного ХЛЛ предварительно инкубировали с V19S76K-5C8 или контрольной средой и затем культивировали с gmCD40L в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 5.

Результаты

gmCD40L приводил к более высокой экспрессии CD80, CD86 и CD95, что свидетельствует о стимулировании CD40 (Фиг.8А-С). Предварительное инкубирование с V19S76K-5C8 предотвращало эффекты стимулирования CD40 дозозависимым образом.

Заключение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 сохраняет антагонистическую активность в отношении CD40.

Пример 10: Биспецифическое антитело сенсibiliзирует клетки первичного ХЛЛ в отношении венетоклакса

Введение

Стимулирование CD40 ведет к резистентности клеток первичного ХЛЛ в отношении венетоклакса (ABT-199), ингибитора анти-апоптозного белка Bcl-2 (Thijssen et al. (2015), Haematologica 100(8):e302-6). Это вероятно вызывается повышением уровня анти-апоптозного белка Bcl-xL. Поскольку V19S76K-5C8 антагонизирует стимулирование CD40, была проанализирована способность V19S76K-5C8 обращать индуцированную CD40 резистентность в отношении венетоклакса.

Материалы и способы

Материал пациентов, антагонистическая активность и чувствительность к венетоклаксу

МКПК первичного ХЛЛ предварительно инкубировали с V19S76K-5C8 (1000 нМ) или контрольной средой и затем культивировали с gmCD40L в течение 48 часов и анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 8. Применяли реагент цитофикс/цитоперм (554722, BD Biosciences) для детектирования внутриклеточного Bcl-xL (13835S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Спустя 48 часов клетки культивировали с указанными концентрациями венетоклакса (Bioconnect, Huissen, the Netherlands) в течение 24 часов.

Измерение жизнеспособности и проточная цитометрия

Жизнеспособность измеряли как описано в Примере 4. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 2.

Результаты

Венетоклакс индуцировал гибель клеток среди не подвергнутых стимулированию клеток первичного ХЛЛ дозозависимым образом (Фиг.9А). Клетки первичного ХЛЛ, подвергнутые стимулированию gmCD40L, были менее чувствительны к венетоклаксу. Однако клетки, которые культивировались с V19S76K-5C8, помимо gmCD40L, были столь же чувствительными к венетоклаксу, что и не подвергнутые стимулированию ХЛЛ клетки. Это

коррелировало с экспрессией Vcl-xL, которая повышалась при стимулировании gmCD40L, но возвращалась к уровням, соответствующим отсутствию стимулирования, когда gmCD40L предшествовало инкубирование V19S76K-5C8 (Фиг.9B).

Заключение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 сенсibiliзирует клетки первичного ХЛЛ в отношении венетоклакса.

Пример 11: Биспецифическое VHH антитело активирует V γ 9V δ 2 Т-клетки

Введение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 может связываться как с CD40 на клетках-мишенях, так и рецептором V γ 9V δ 2 Т-клеток. Анализировали способность V19S76K-5C8 активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки в присутствии CD40⁺ клеток.

Материалы и способы

Линии клеток

CD40⁺ СИИ клетки и V γ 9V δ 2 Т-клетки выращивали как описано в Примере 7.

Цитокины и анализ дегрануляции

Линии V γ 9V δ 2 Т-клеток инкубировали с V19S76K-5C8 или контрольной средой в течение 30 минут при 37°C. Далее V γ 9V δ 2 Т-клетки совместно культивировали с СИИ клетками в течение 4 часов при соотношении 1:1 в присутствии брефельдина А (10 мкг/мл; B7651, Merck), GolgiStop (554724), GolgiStop (554724) и конъюгированных с PEcy7 антител против CD107a (561348, both BD Biosciences). Затем клетки промывали и осуществляли поверхностное окрашивание с помощью Fixable Viability Dye eFluor506 (65-0866-14), конъюгированных с AF700 антител против CD3 (56-0038-82, оба Thermo Fisher Scientific) и конъюгированных с FITC-conjugated anti антител против TCR V γ 9 (IM1463, Beckman Coulter). Применяли реагент

цитофикс/цитоперм (554722) для детектирования внутриклеточных цитокинов с конъюгированными с BUV395 антителами против IFN- γ (563563), конъюгированными с BV650 антителами против TNF- α (563418, все BD Biosciences) и конъюгированными с PE/Dazzle594 антителами против IL-2 (500343, Biolegend).

Проточная цитометрия

Образцы подвергали измерению на цитометре LSRFortessa (BD Biosciences) и анализировали с помощью Flowjo MacV10.

Результаты

V γ 9V δ 2 T-клетки почти не подвергались дегрануляции при культивировании самостоятельно или с CII клетками (Фиг.10A). Однако когда присутствовали как V19S76K-5C8, так и CD40⁺ CII клетки, большое количество V γ 9V δ 2 T-клеток подвергались дегрануляции. V19S76K-5C8 не индуцирует данный уровень дегрануляции, когда CD40⁺ CII клетки отсутствуют. Аналогичный паттерн наблюдали при продуцировании IFN- γ , TNF- α и IL-2 (Фиг.10B-D).

Заключение

Биспецифическое VHH V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 активирует V γ 9V δ 2 T-клетки в присутствии CD40⁺ клеток.

Пример 12: Биспецифические VHH антитела повышают цитотоксичность против CD40⁺ клеток

Введение

Биспецифические VHH против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 V15-5C8t и V19-5C8 связываются как с CD40, так и V γ 9V δ 2 T-клетками. Анализировали, индуцируют ли биспецифические VHH также цитотоксичность в отношении CD40⁺ клеток-мишеней.

Материалы и способы

Получение VHH

Биспецифические VHN V15-5C8t и V19S76K-5C8 получали как описано в Примере 1.

Линии клеток

CD40⁺ CII клетки и Vγ9Vδ2 T-клетки выращивали как описано в Примере 7.

Анализ цитотоксичности

CII клетки-мишени метили сложным сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE; C1157, Thermo Fisher Scientific) и инкубировали с VHN или контрольной средой в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки-мишени совместно культивировали в течение ночи с линиями Vγ9Vδ2 T-клеток при соотношении 1:1.

Измерение жизнеспособности и проточная цитометрия

Жизнеспособность измеряли как описано в Примере 4.

Результаты

Vγ9Vδ2 T-клетки лизировали только малую часть CII клеток-мишеней (Фиг.11A). Лизис CII клеток-мишеней заметно повышался при добавлении V19S76K-5C8 дозозависимым образом. Аналогичные результаты получали с V15-5C8t и V12-5C8t, хотя V12-5C8t был менее эффективным (данные не показаны). Половина максимальной эффективной концентрации для V19S76K-5C8 представляла собой 9,1 пМ (Фиг.11B).

Заключение

Биспецифические VHN против CD40 и TCR Vγ9Vδ2 повышают цитотоксичность в отношении CD40⁺ клеток.

Пример 13: Цитотоксичность биспецифических VHN является CD40-специфической

Введение

Биспецифические VHN V19S76K-5C8 против CD40 и TCR Vγ9Vδ2 повышают цитотоксичность в отношении CD40⁺ клеток-мишеней. Анализировали специфичность повышенной цитотоксичности в отношении CD40.

Материалы и способы*Линии клеток*

Клетки HEK293T дикого типа (WT) или трансфицированные CD40 человека выращивали как описано в Примере 2. V γ 9V δ 2 T-клетки выращивали как описано в Примере 7.

Анализ цитотоксичности

Эксперимент для определения цитотоксичности, измерение жизнеспособности и проточную цитометрию осуществляли как описано в Примере 12.

Результаты

V γ 9V δ 2 T-клетки лизировали приблизительно на 20% как HEK293T клетки дикого типа, так и трансфицированные CD40 HEK293T клетки (Фиг.12). Добавление V19S76K-5C8 сильно стимулировало лизис трансфицированных CD40 HEK293T клеток, но не CD40-отрицательных HEK293T клеток дикого типа. V19S76K-5C8 не индуцировало лизис HEK293T клеток дикого типа или CD40-трансфицированных HEK293T клеток без V γ 9V δ 2 T-клеток.

Заключение

Биспецифическое VHN против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 повышает цитотоксичность CD40-специфичным образом.

Пример 14: Биспецифические VHN антитела повышают цитотоксичность против клеток первичного ХЛЛ

Введение

Биспецифические VHN против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 V15-5C8t, V19-5C8t и V12-5C8t повышают цитотоксичность CD40⁺ клеток-мишеней, при этом теперь анализировали влияние на цитотоксичность в отношении клеток первичного ХЛЛ.

Материалы и способы*Материал пациентов и линии клеток*

Клетки первичного ХЛЛ получали, замораживали и размораживали как описано в Примере 3. V γ 9V δ 2 Т-клетки выращивали как описано в Примере 7.

Анализ цитотоксичности

Эксперимент для определения цитотоксичности, измерение жизнеспособности и проточную цитометрию осуществляли как описано в Примере 12.

Результаты

V γ 9V δ 2 Т-клетки лизировали малую часть клеток первичного ХЛЛ (Фиг.13), при этом их доля повышалась при использовании V12-5C8t (100 нМ; 45,3% \pm 4,0) и особенно V15-5C8t (70,5% \pm 7,3) и V19-5C8t (68,5% \pm 7,9).

Заключение

Биспецифические VНН против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 повышают цитотоксичность в отношении клеток первичного ХЛЛ.

Пример 15: Биспецифическое VНН антитело является эффективным против стимулированных CD40 клеток ХЛЛ

Введение

Биспецифическое VНН V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 повышает цитотоксичность в отношении клеток первичного ХЛЛ. Стимулирование CD40 повышает резистентность клеток первичного ХЛЛ в отношении различных лекарств, например венетоклакса (ABT-199; Thijssen et al. (2015), Haematologica 100(8):e302-6). Таким образом, анализировали чувствительность стимулированных CD40 клеток первичного ХЛЛ в отношении индуцированной V19S76K-5C8 цитотоксичности.

Материалы и способы

Материал пациентов и линии клеток

Клетки первичного ХЛЛ получали, замораживали и размораживали как описано в Примере 3. ЗТЗ фибробласты дикого типа или трансфицированные CD40L человека (ЗТ40L) выращивали в полной среде IMDM. V γ 9V δ 2 Т-клетки выращивали как описано в Примере 7.

Стимулирование CD40

Клетки первичного ХЛЛ культивировали в течение 72 часов на облученных ЗТЗ или ЗТ40L фибробластах для индуцирования стимулирования CD40.

Анализ цитотоксичности

Затем клетки собирали и культивировали в течение ночи с венетоклаксом (10 нМ), как описано в Примере 10, или с V γ 9V δ 2 Т-клетками и V19S76K-5C8, как описано в примере 21. Осуществляли измерение жизнеспособности и проточную цитометрию, как описано в Примере 10.

Результаты

Венетоклакс индуцировал гибель клеток среди большего количества нестимулированных клеток ХЛЛ, однако индуцированное ЗТ40L стимулирование CD40 повышало резистентность клеток ХЛЛ в отношении венетоклакса (Фиг.14). Напротив, V19S76K-5C8 индуцировало цитотоксичность в нестимулированных и стимулированных CD40 клетках ХЛЛ в равной степени.

Заключение

Биспецифическое VHH антитело V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 является эффективным против стимулированных CD40 клеток ХЛЛ.

Пример 16: Биспецифическое VHH антитело активирует аутологичные V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ

Введение

Биспецифическое VHH антитело V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 активирует линии V γ 9V δ 2 Т-клеток в присутствии CD40⁺ клеток. Анализировали способность V19S76K-5C8 активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ в присутствии их собственных ХЛЛ клеток.

Материалы и способы

Материал пациентов

МКПК пациентов с ХЛЛ получали, замораживали и размораживали как описано в Примере 3.

Цитокины и анализ дегрануляции

В МКПК ХЛЛ частично снижали содержание CD19⁺ клеток ХЛЛ с помощью магнитных шариков (130-050-301, Miltenyi Biotec. ±50% МКПК являлись CD19⁺ после снижения содержания CD19). Затем МКПК культивировали в течение ночи с V19S76K-5C8 (10 нМ) или контрольной средой в присутствии брефельдина А, GolgiStop и антитела против CD107a для измерения продуцирования цитокинов и дегрануляции, как описано в Примере 11. В отличие от Примера 11, поверхностное окрашивание включало конъюгированные с PE антитела против TCR V γ 9 (2256535, Sony) и конъюгированные с FITC антитела козы против тяжелой и легкой цепи IgG лампы (A160-100F, Bethyl Laboratories Inc.).

Результаты

V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ продуцировали цитокины IFN- γ (Фиг.15A), TNF- α (Фиг.15B) и IL-2 (Фиг.15C) после культивирования с V19S76K-5C8. Аналогичным образом, V19S76K-5C8 индуцировало дегрануляцию V γ 9V δ 2 Т-клеток, что было определено на основе экспрессии CD107a (Фиг.15D).

Заключение

Биспецифическое VHH антитело V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 активирует аутологичные V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ.

Пример 17: Биспецифическое VHH антитело индуцирует цитотоксичность клеток ХЛЛ за счет аутологичных V γ 9V δ 2 Т-клеток

Введение

Биспецифическое VHH антитело V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 активирует аутологичные V γ 9V δ 2 Т-клетки от пациентов с ХЛЛ. Определяли, ведет ли это также к лизису аутологичных клеток ХЛЛ.

Материалы и способы

Материал пациентов

МКПК пациентов с ХЛЛ получали, замораживали и размораживали как описано в Примере 3.

Анализ цитотоксичности

CD3⁺ клетки выделяли из МКПК ХЛЛ с помощью магнитных шариков (чистота $\geq 93\%$; 130-050-101, Miltenyi Biotec) для одновременного повышения содержания V γ 9V δ 2 Т-клеток. CD19⁺ клетки ХЛЛ выделяли из того же образца с помощью магнитных шариков (чистота $\geq 93\%$; 130-050-301, Miltenyi Biotec). CD3⁺ клетки культивировали в течение ночи с CD19⁺ клетками ХЛЛ при соотношении 10:1 с V19S76K-5C8 (10 нМ) или контрольной средой.

Проточная цитометрия

Образцы инкубировали с Fixable Viability Dye eF780 (65-0865-14), конъюгированное с PerCPeF710 антитело против CD3), конъюгированными с PE антителами против CD5 (12-0059-42, все Thermo Fisher Scientific) и конъюгированными с FITC антителами против CD20 (A07772, Beckman Coulter). Затем живые ХЛЛ клетки подвергали количественному анализу с помощью шариков для подсчета клеток (01-1234-42, Thermo Fisher Scientific) на цитометре FACSCanto (BD Biosciences).

Результаты

Меньшее количество ХЛЛ клеток было живым после культивирования с V19S76K-5C8, чем с контрольной средой (Фиг.16), что указывает на индуцированный V19S76K-5C8 лизис ХЛЛ клеток.

Заключение

Биспецифическое VHH антитело V19S76K-5C8 против CD40 и TCR V γ 9V δ 2 индуцирует цитотоксичность клеток ХЛЛ за счет аутологических V γ 9V δ 2 Т-клеток

Пример 18: Биспецифическое VHH активно против первичной множественной миеломы

Поскольку CD40 также экспрессируется на клетках первичной множественной миеломы (ММ) (Pellat-Deceunynck et al. (1994) Blood 84:2597) (Фиг.17А) и стимуляция CD40 приводит к различным биологическим эффектам, включая пролиферацию клеток ММ, авторы проанализировали эффективность V19S76K-5C8 на первичных образцах костного мозга пациентов с ММ. При культивировании в течение ночи в присутствии биспецифического VHH полученные от здоровых доноров V γ 9V δ 2 Т-клетки лизировали клетки первичной ММ (Фиг.17В).

Более того, V γ 9V δ 2 Т-клетки, присутствующие в костном мозге данных пациентов, были простимулированы для продуцирования провоспалительных цитокинов IFN- γ и TNF- α при культивировании с V19S76K-5C8 (Фиг.17С). Аналогичным образом, V γ 9V δ 2 Т-клетки, присутствующие в мононуклеарных клетках костного мозга от пациентов с ММ, подвергались дегрануляции после культивирования с биспецифическим VHH V19S76K-5C8 (Фиг.17D).

Совместно данные результаты указывают на то, что V19S76K-5C8 является активным против первичной ММ и может активировать аутологичные полученные из костного мозга V γ 9V δ 2 Т-клетки.

Пример 19: Биспецифическое VHH антитело предотвращает чрезмерный рост опухоли в рамках модели ксенотрансплантата

Для изучения влияния биспецифического VHH антитела на рост опухолей *in vivo* иммунодефицитным NSG мышам инъецировали клетки ММ.1s, линии клеток множественной миеломы человека. Опухолевым клеткам давали расти и приживаться в течение 1 недели перед тем, как мыши получали первую из трех еженедельных в/в инъекций V γ 9V δ 2 Т-клеток человека или PBS и далее проводимые два раза в неделю внутрибрюшинные инъекции V19S76K-5C8 или PBS (Фиг.18А). Ни V19S76K-5C8 самостоятельно, ни V γ 9V δ 2 клетки

самостоятельно значительно не улучшали общую выживаемость. Напротив, мыши, подвергнутые лечению как V19S76K-5C8, так и Vγ9Vδ2 T-клетками, жили значительно дольше, при этом медианная общая выживаемость составляла 80 дней против 47 дней у контрольной группы (Фиг.18B).

В момент умерщвления экспрессия CD40 была значительно ниже на злокачественных клетках в костном мозге мышей, подвергнутых лечению как V19S76K-5C8, так и Vγ9Vδ2 T-клетками, чем у контрольных мышей (Фиг.18C). Аналогичная тенденция наблюдалась и в плане злокачественных плазматических клеток в идентифицированных с помощью макроскопии плазмоцитомах (Фиг.18D).

Мыши, подвергнутые лечению как V19S76K-5C8, так и Vγ9Vδ2 T-клетками, сохраняли их первоначальную массу тела спустя 7 недель лечения (Фиг.18E).

В завершение, биспецифическое VHH антитело повышает выживаемость в рамках *in vivo* модели ММ в зависимости от присутствия Vγ9Vδ2 T-клеток.

Формула изобретения

1. Мультиспецифическое антитело, включающее первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связывать рецептор V γ 9V δ 2 Т-клеток человека.
2. Мультиспецифическое антитело по п.1, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.
3. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.
4. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.
5. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок ковалентно связаны через пептидный линкер.
6. Мультиспецифическое антитело по п.5, отличающееся тем, что пептидный линкер включает или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:21.
7. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих

пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок расположен на N-конце второго антигенсвязывающего участка.

8. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело моновалентно связывается с CD40 и моновалентно связывается с рецептором V γ 9V δ 2 T-клеток человека.

9. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело не является агонистом CD40 человека.

10. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело представляет собой антагонист CD40 человека.

11. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело способно sensibilizировать экспрессирующие CD40 человека клетки в отношении венетоклакса.

12. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

13. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело связывается

с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

14. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок включает

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6.

15. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок является гуманизированным.

16. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок включает или состоит из:

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или
- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%,

например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%,
например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере 98%
идентичность последовательности относительно последовательности,
указанной в SEQ ID NO:14.

17. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело способно активировать V γ 9V δ 2 T-клетки человека.

18. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель экспрессирующих CD40 человека клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом и/или от пациента с множественной миеломой.

19. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель экспрессирующих CD40 человека клеток от пациента с хроническим лимфолейкозом, которые были стимулированы CD40L.

20. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело способно связываться с V δ 2 человека.

21. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание V δ 2 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или конкурирует за связывание V δ 2 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:18.

22. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что мультиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на V δ 2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, или связывается с тем же эпитопом на V δ 2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:18.

23. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:7, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:8, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:9, или включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:12.

24. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий участок является гуманизированным.

25. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что второй антигенсвязывающий участок включает или состоит из

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или
- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или

- последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34.

26. Мультиспецифическое антитело по любому одному из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок включает

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6,

и при этом второй антигенсвязывающий участок включает последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:7, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:8, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:9.

27. Антитело, включающее первый антигенсвязывающий участок, способный связывать CD40 человека, при этом антитело конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, и/или конкурирует за связывание CD40 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

28. Антитело по п.27, отличающееся тем, что антитело связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:13, или связывается с тем же эпитопом на CD40 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:14.

29. Антитело по п.27 или п.28, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок включает

- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:1, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:2, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:3, или
- последовательность VH CDR1, указанную в SEQ ID NO:4, последовательность VH CDR2, указанную в SEQ ID NO:5, и последовательность VH CDR3, указанную в SEQ ID NO:6.

30. Антитело по любому одному из п.п.27-29, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок включает или состоит из:

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, указанной в SEQ ID NO:14, или
- последовательности, имеющей, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере, 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:13, или последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90%, например, по меньшей мере, 92%, например, по меньшей мере, 94%, например, по меньшей мере, 96%, например, по меньшей мере 98% идентичность последовательности относительно последовательности, указанной в SEQ ID NO:14.

31. Антитело по любому одному из п.п.27-30, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий участок представляет собой однодоменное антитело.

32. Антитело по любому одному из п.п.27-31, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноспецифическое антитело, например моновалентное антитело.

33. Антитело по любому одному из п.п.27-31, отличающееся тем, что антитело включает второй антигенсвязывающий участок, который связывается с антигеном, который не является CD40 или V δ 2 человека.

34. Антитело по любому одному из п.п.27-33, имеющее одно или несколько свойств, определенных в п.п.9-11.

35. Фармацевтическая композиция, включающая мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

36. Мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34 для применения в качестве лекарства.

37. Мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34 для применения при лечении рака.

38. Мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34 для применения при лечении хронического лимфолейкоза, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, ходжкинской лимфомы, фолликулярной лимфомы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака легкого, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака простаты, В-клеточной лимфомы/лейкемии, лимфомы Беркитта или острого В-лимфобластного лейкоза.

39. Мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 для

применения при лечении хронического лимфолейкоза или множественной миеломы.

40. Мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34 для применения в соответствии с любым одним из п.п.36-39, отличающееся тем, что указанное применение представляет собой комбинацию с блокатором Vcl-2, например венетоклаксом.

41. Способ лечения заболевания, включающий введение мультиспецифического антитела по любому одному из п.п.1-26 или антитела по любому одному из п.п.27-34 нуждающемуся в этом субъекту, представляющему собой человека.

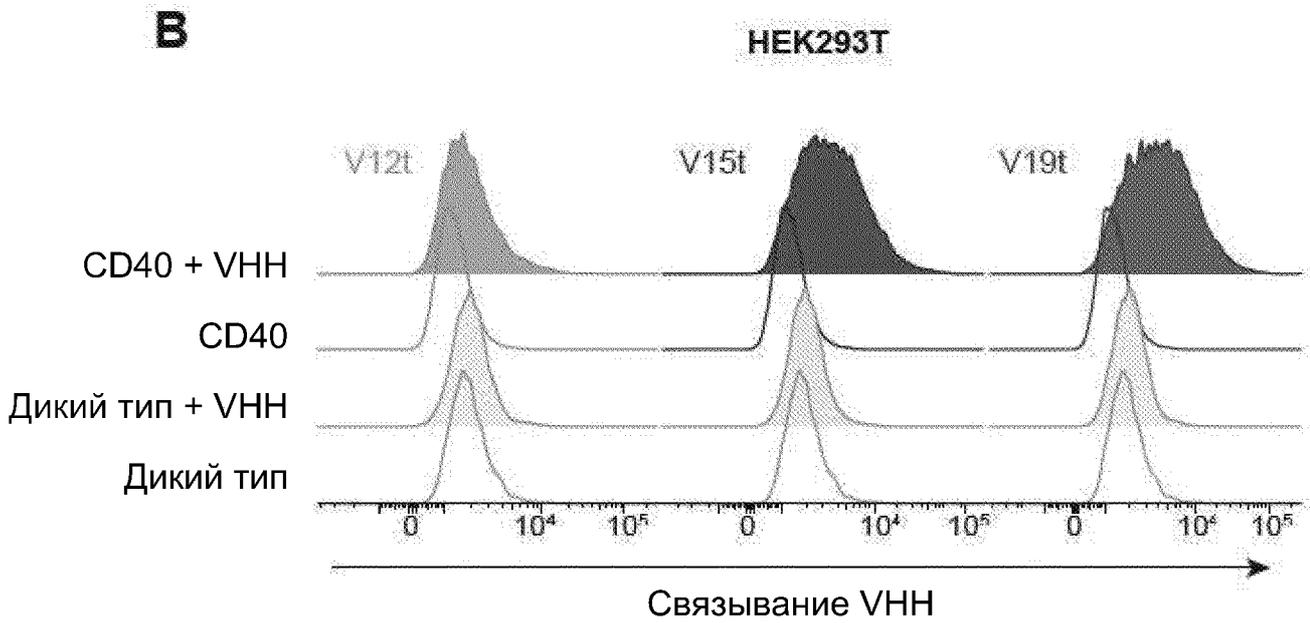
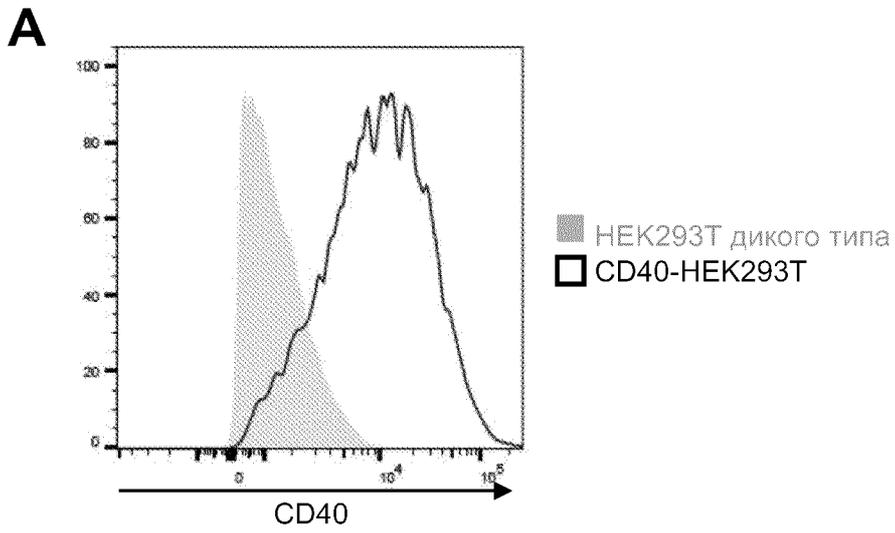
42. Способ по п.41, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

43. Конструкт нуклеиновых кислот, кодирующих мультиспецифическое антитело по любому одному из п.п.1-26 или антитело по любому одному из п.п.27-34.

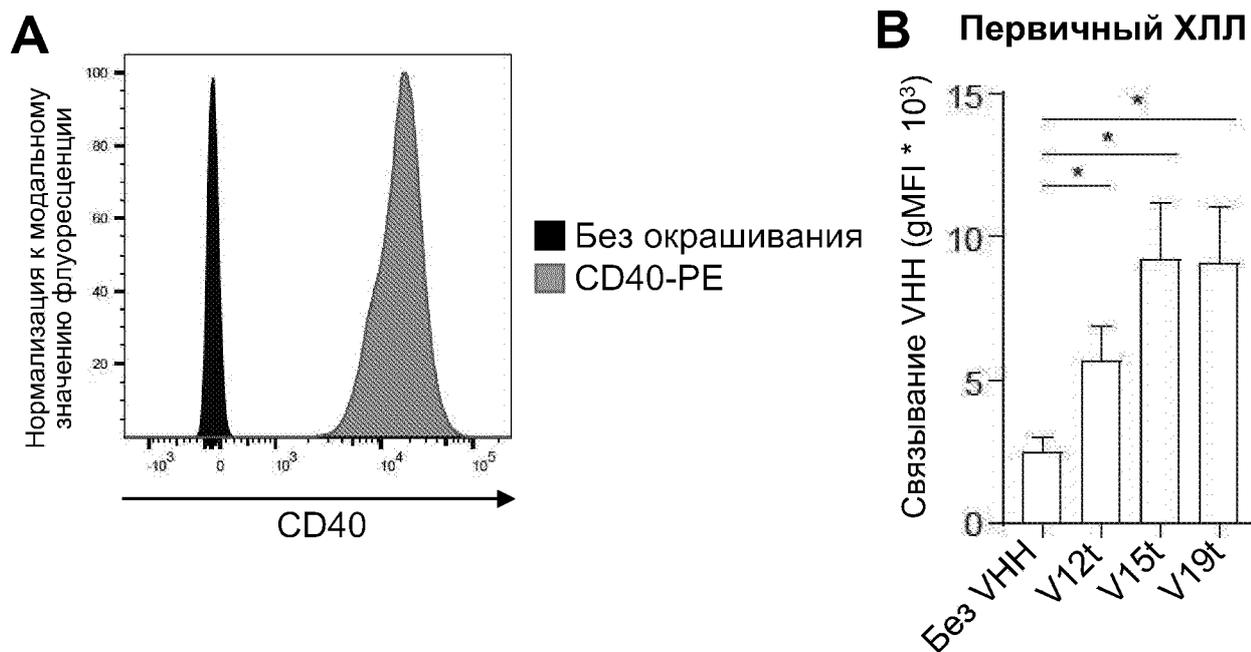
44. Вектор экспрессии, включающий конструкт нуклеиновых кислот по п.43.

45. Клетка-хозяин, включающая конструкт нуклеиновых кислот по п.43 или вектор экспрессии по п.44.

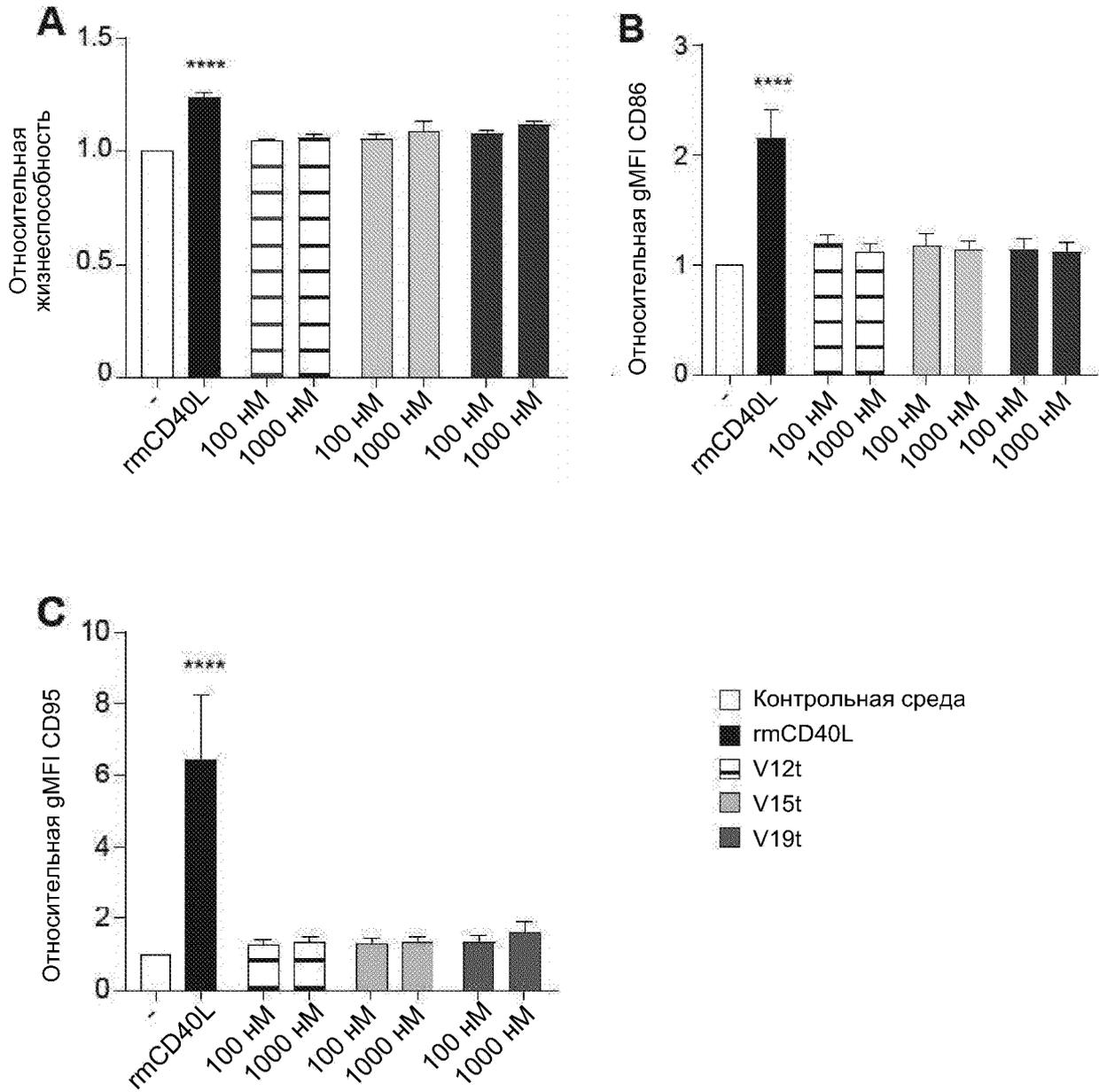
Фиг.1



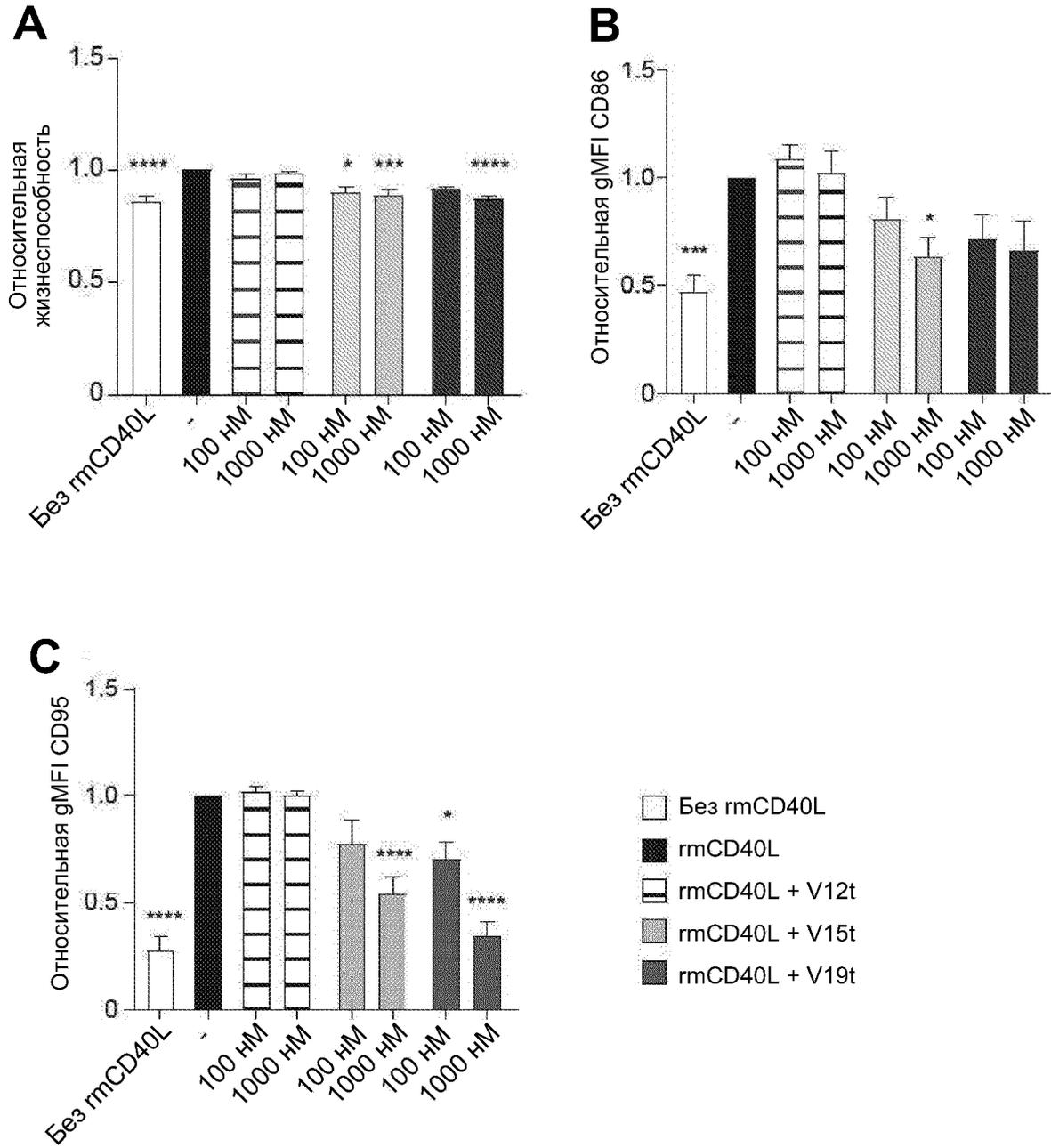
Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4



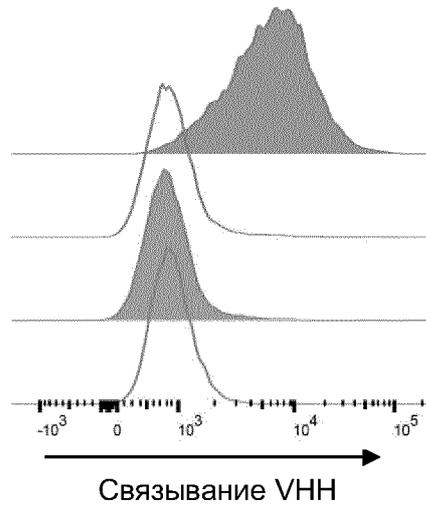
Фиг.5

CD40-HEK293T +
биспецифическое VHH

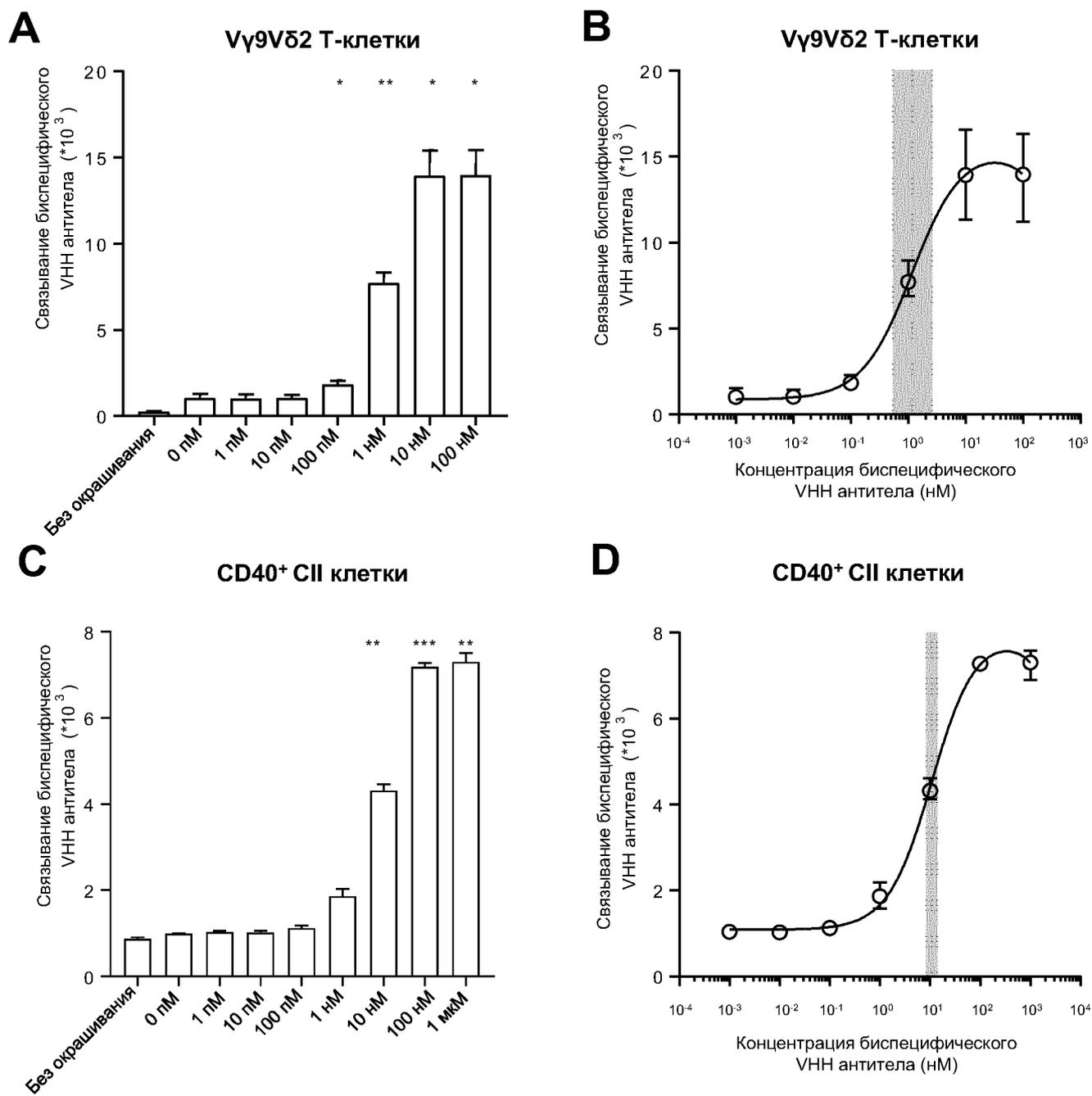
CD40-HEK293T

HEK293T дикого типа +
биспецифическое VHH

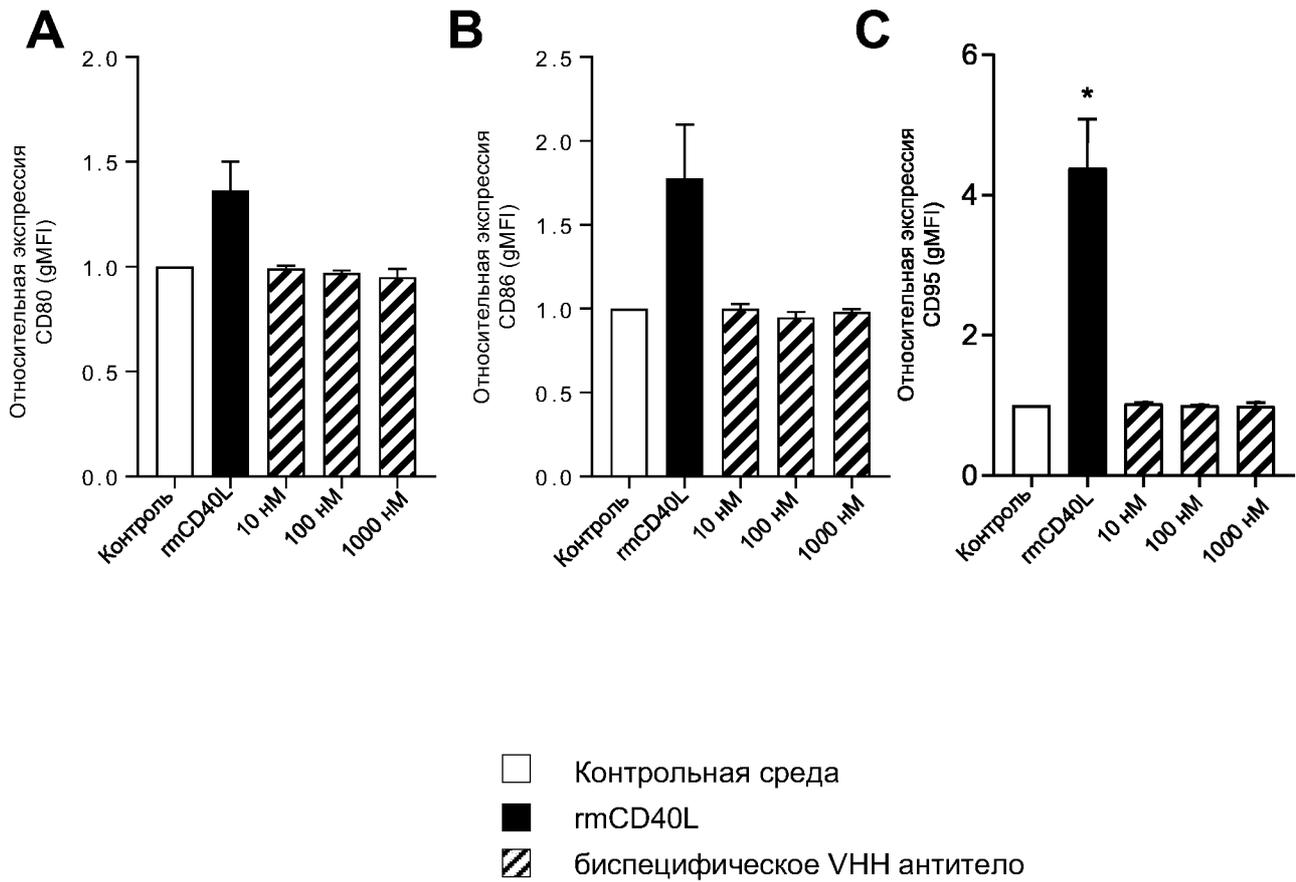
HEK293T дикого типа



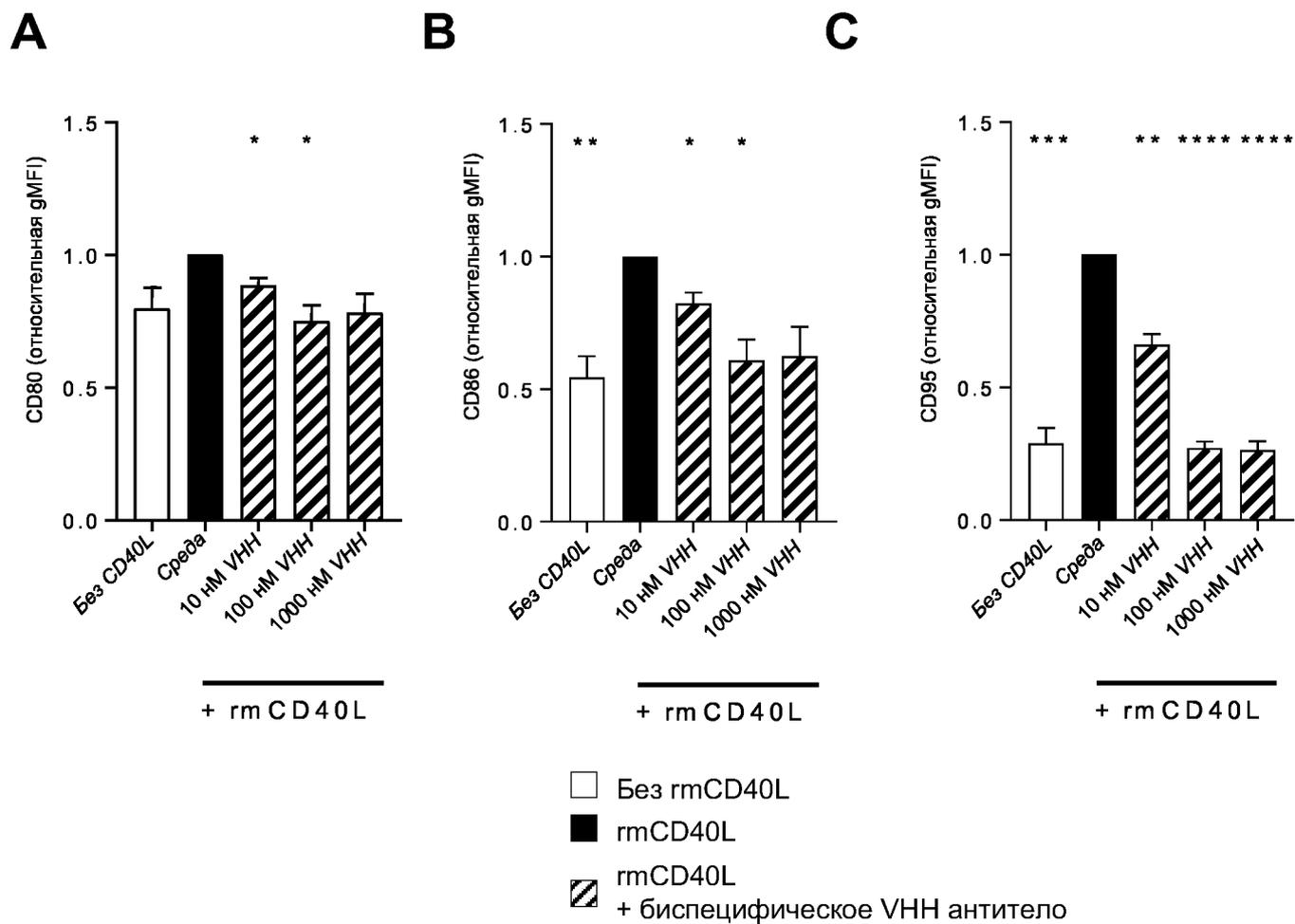
Фиг.6



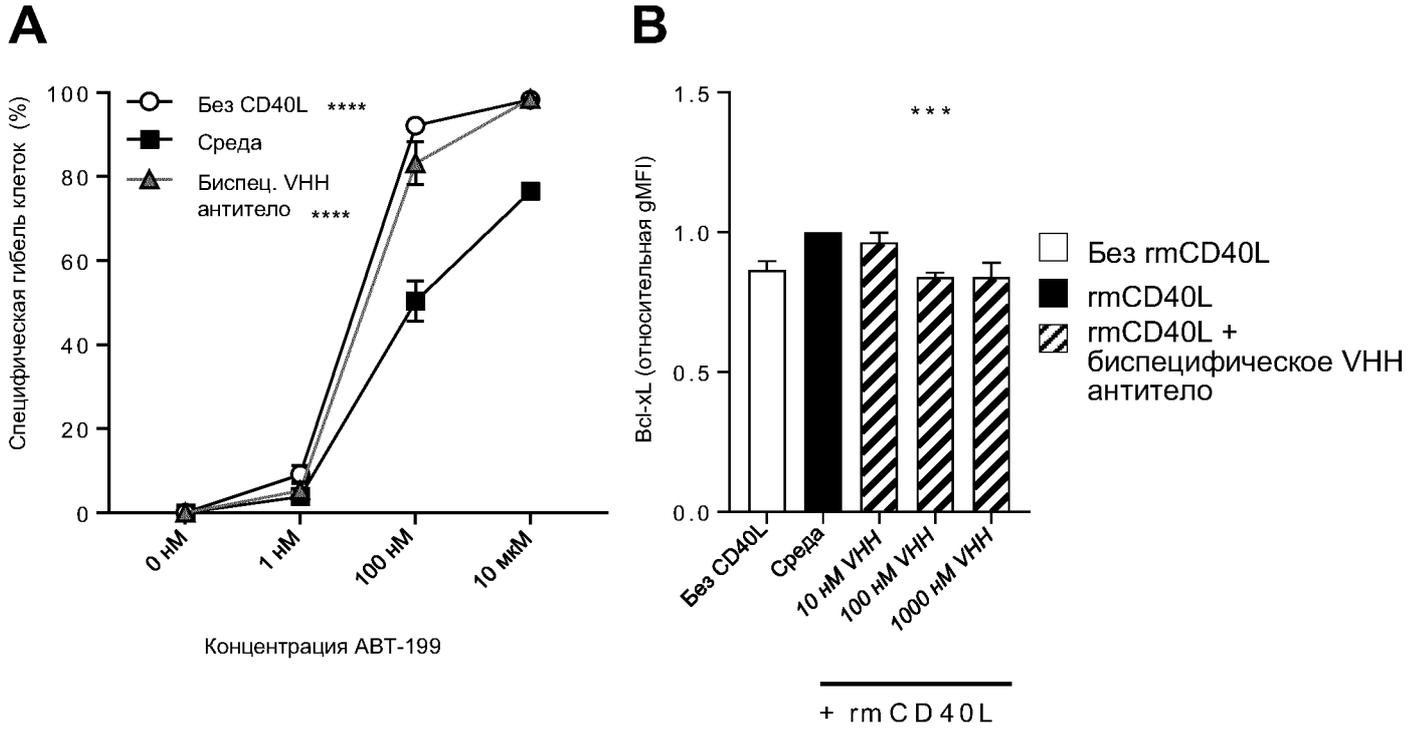
Фиг.7



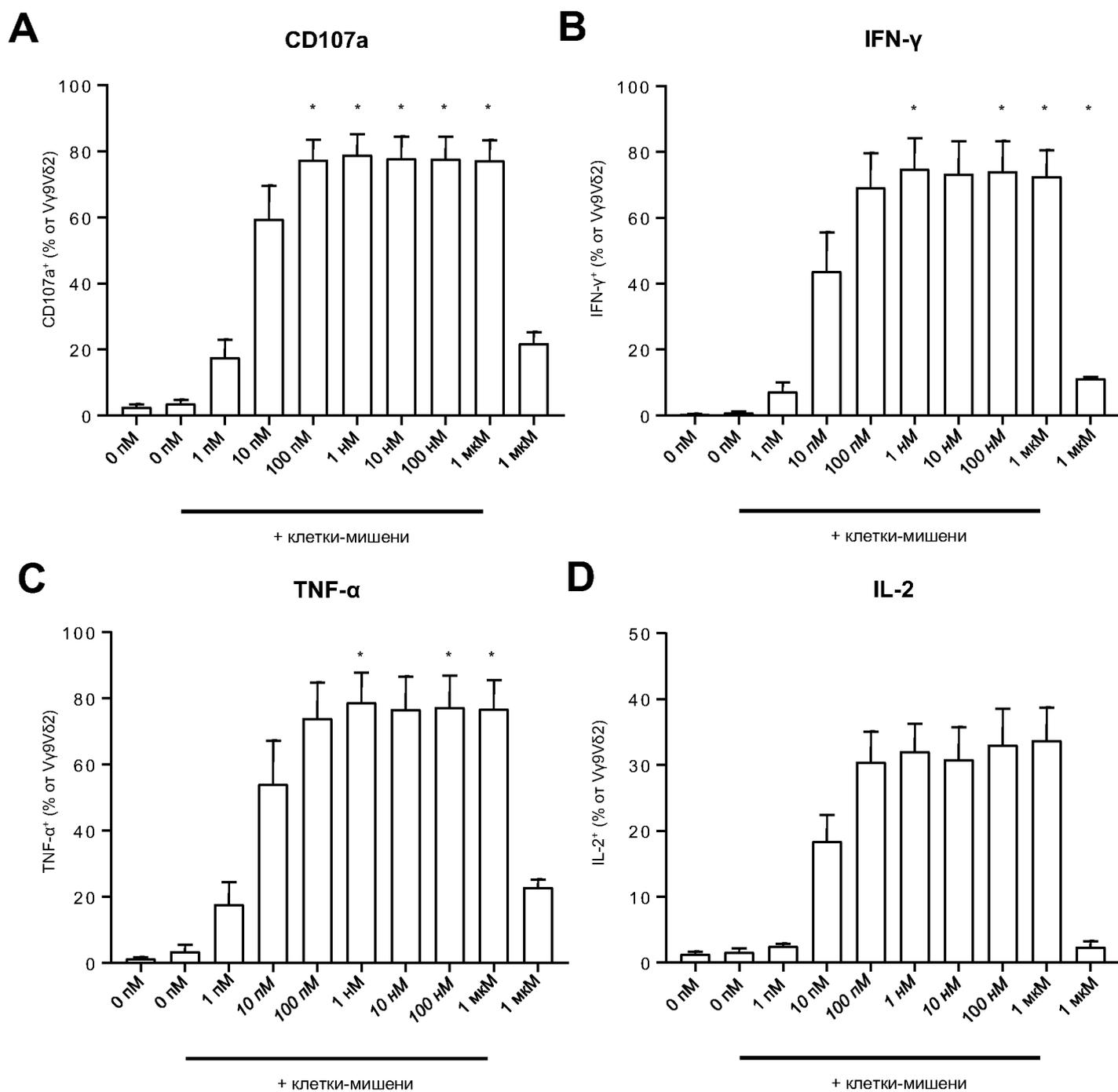
Фиг.8



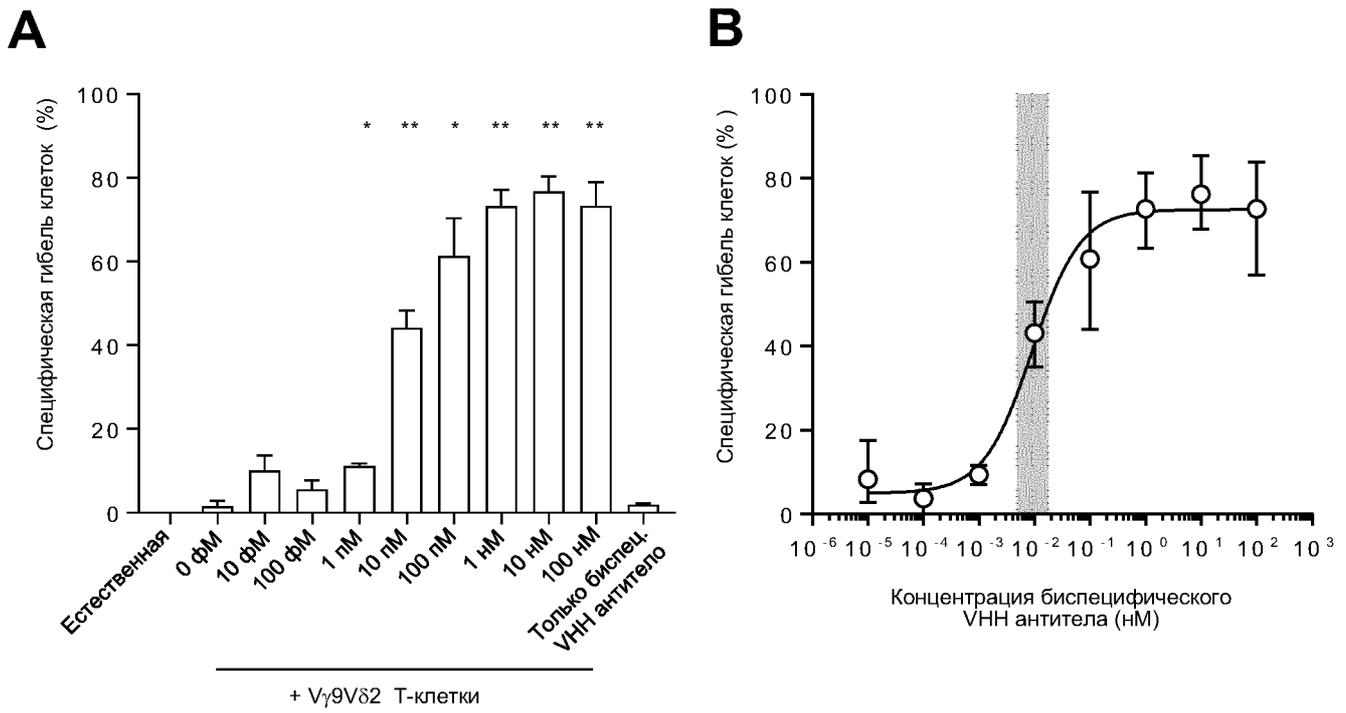
Фиг.9



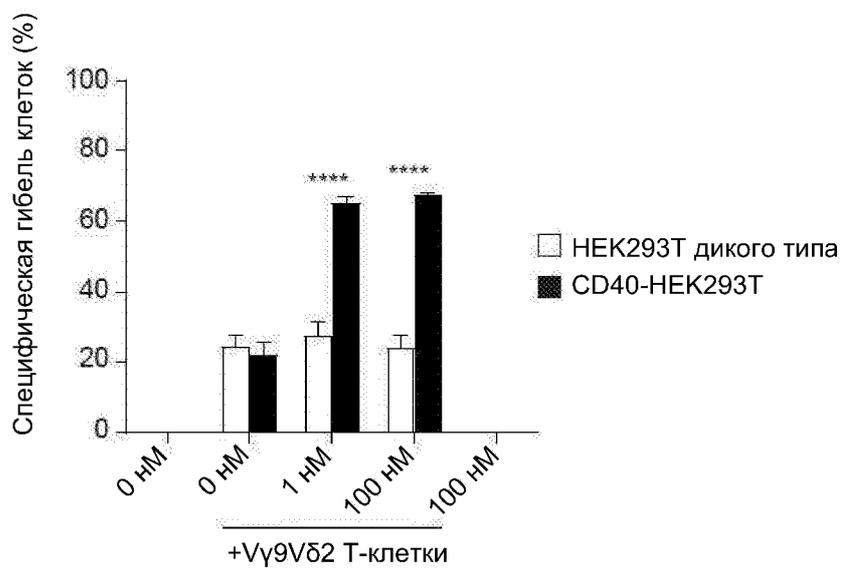
Фиг.10



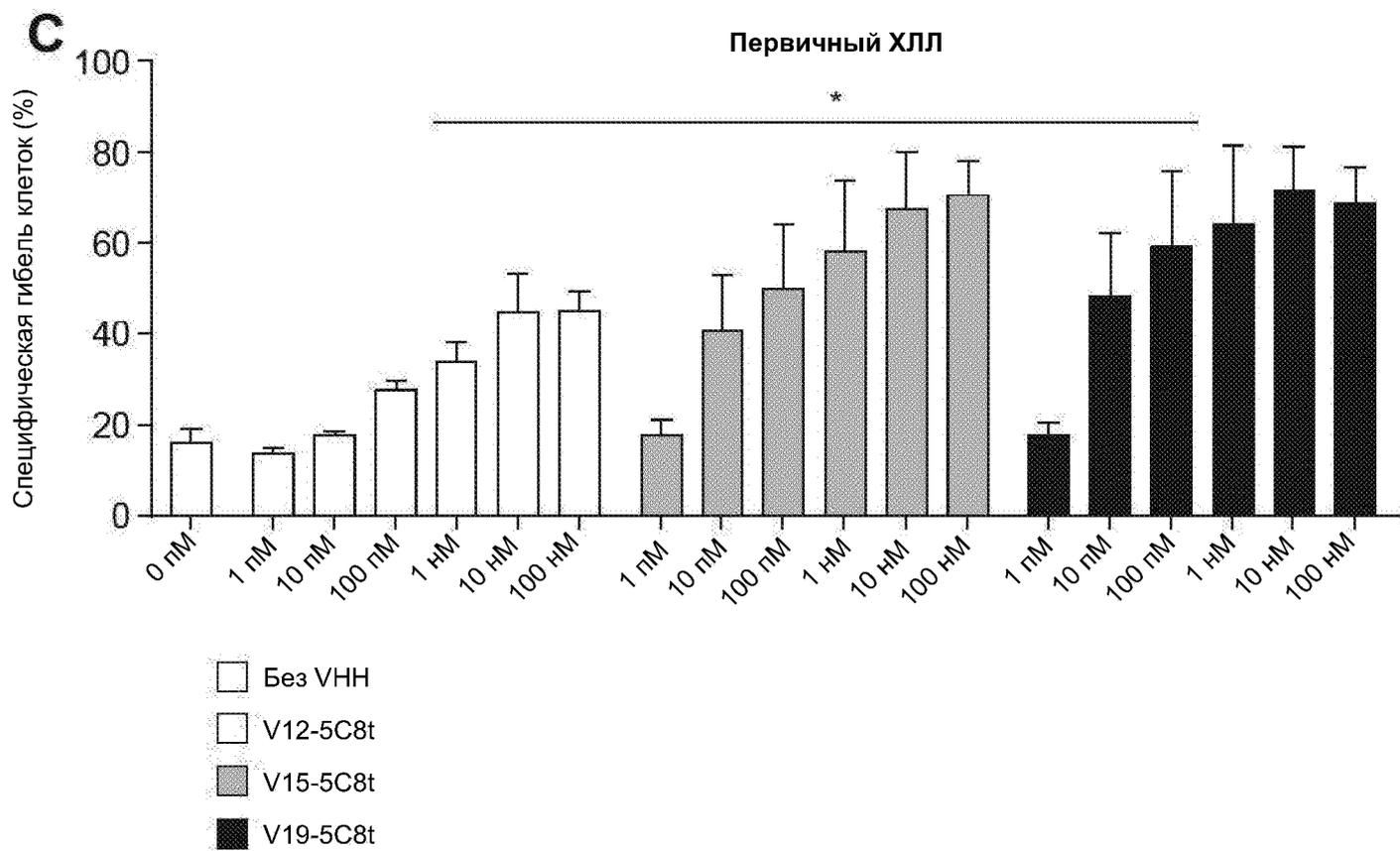
Фиг.11



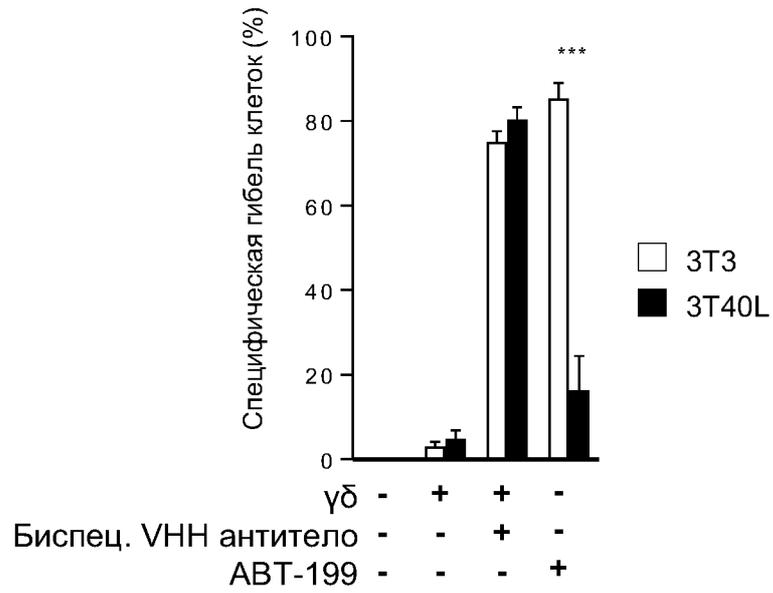
Фиг.12



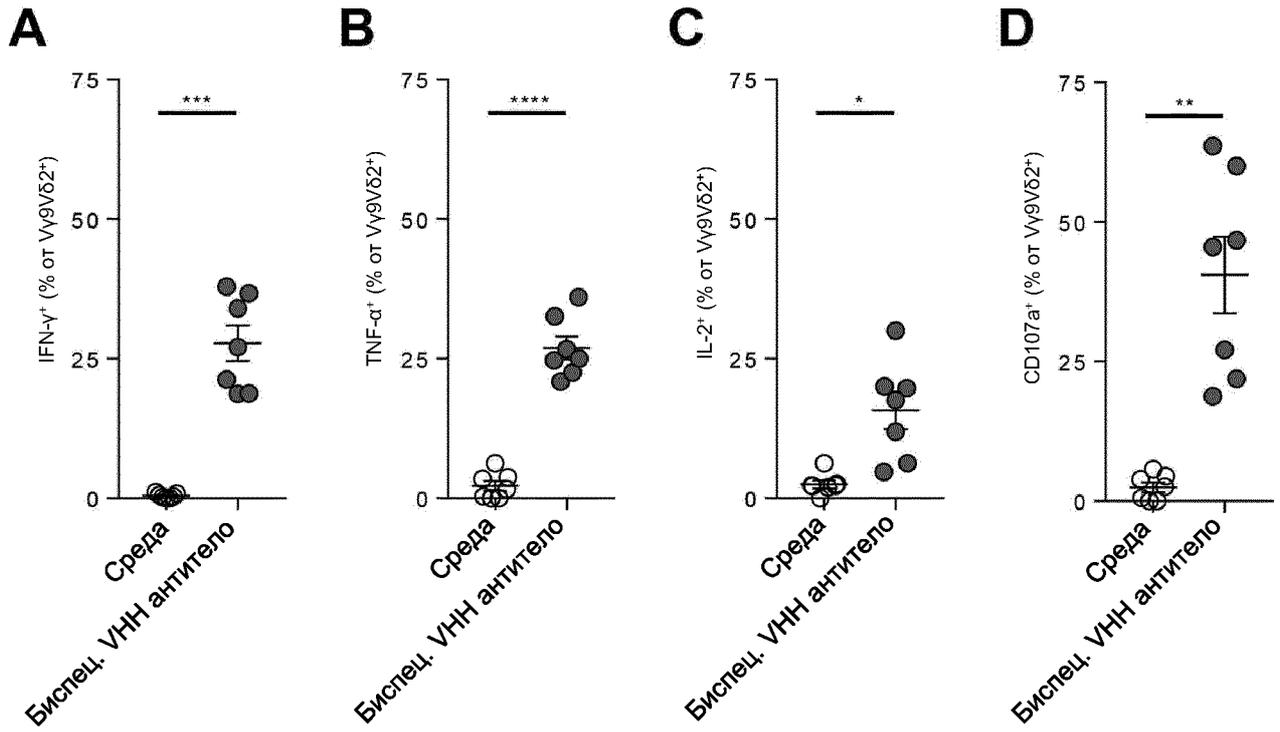
Фиг.13



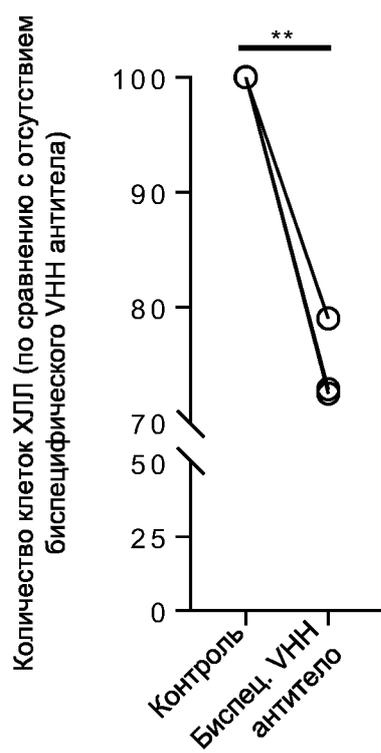
Фиг.14



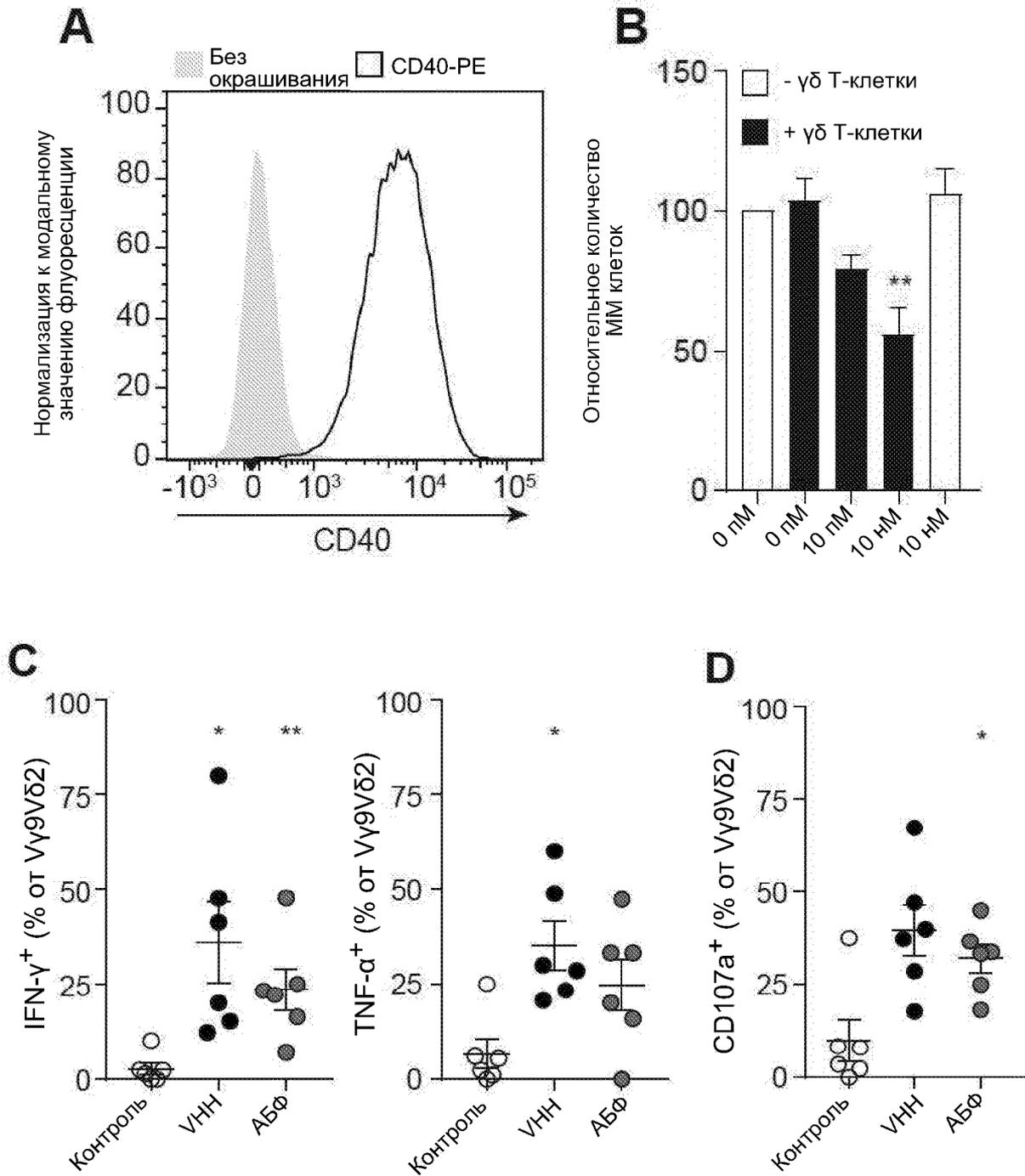
Фиг.15



Фиг.16



Фиг.17



Фиг.18

