

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390699 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.27

(22) Дата подачи заявки
2021.08.25

(51) Int. Cl. *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
АНТАГОНИСТИЧЕСКИМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К CD40

(31) 63/070,209

(32) 2020.08.25

(33) US

(86) PCT/US2021/047610

(87) WO 2022/046942 2022.03.03

(71) Заявитель:
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Йе Йинг, Арас Урви, Шарда Нидхи,
Стразерс Мэри, Прайс Карен, Гигрис
Ихаб, Фура Аберра (US)

(74) Представитель:
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,
Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) Предложен способ лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена. Способ предусматривает введение антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с эпитопом CD40, связанного с антагонистическим действием. Антитело или его антигенсвязывающая часть не проявляют агонистической активности в отношении CD40 в доклинических испытаниях в условиях *in vitro* и *in vivo*. Антитело ингибирует индуцированную CD40L передачу сигналов на DC, что, по меньшей мере, частично приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов и снижению уровня маркеров активации клеточной поверхности, таких как CD86 и CD54. Антитела могут содержать область Fc, содержащую мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание с Fc-рецепторами, тем самым уменьшая или устраняя перекрестное связывание или кластеризацию, опосредованную Fc-гамма-рецептором (FcγR).

Последовательность аминокислот тяжелой цепи BMS-986325:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYN
EKFKRTVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFP LAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPCPAPELLGCKSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 5)

Последовательность аминокислот легкой цепи BMS-986325:

DIQMTQSPSFSLASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASYRYTGVPSPR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOHYSTFWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 11)

A1

202390699

202390699

A1

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
АНТАГОНИСТИЧЕСКИМИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К CD40

ОПИСАНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 63/070,209, поданной 25 августа 2020 г., полное содержание которой включено в настоящий документ для всех целей.

Перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в виде файла в формате ASCII, и он полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Файл в формате ASCII, созданный 22 августа 2021 года, имеет название 200896-0017-00-WO-000026_SL.txt, и его размер составляет 53479 байт.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] В изобретении предложены способы лечения аутоиммунного заболевания антителами, которые связывают CD40 и не проявляют агонистической активности в отношении CD40. Антитела содержат модифицированный домен Fc IgG1 и характеризуются минимальной активацией незрелых дендритных клеток. Также предложены соответствующие дозы и схемы введения антител против CD40.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] CD40 представляет собой костимулирующую молекулу, принадлежащую к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), которая присутствует на поверхности антигенпрезентирующих клеток (APC), включая дендритные клетки, В-клетки и макрофаги. APC активируются при связывании CD40 с его лигандом, CD 154 (CD40L), на поверхности Тн-клеток. CD40-опосредованная активация APC вовлечена в целый ряд иммунных реакций, включая выработку цитокинов, положительную регуляцию костимулирующих молекул (таких как CD86) и повышенный уровень представления антигенов и пролиферации В-клеток. CD40 также может экспрессироваться

эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками, фибробластами и эпителиальными клетками.

[0005] Активация CD40 также вовлечена в целый ряд нежелательных Т-клеточных ответов, относящихся, например, к аутоиммунным реакциям, отторжению трансплантата или аллергических реакций. Одной из стратегий контроля нежелательных Т-клеточных ответов является целенаправленное воздействие на CD40 с использованием антагонистического антитела. Например, моноклональное антитело HCD122 (лукатумумаб), ранее известное как Chiron 1212, в настоящее время является объектом клинических испытаний в отношении лечения определенных CD40-опосредованных воспалительных заболеваний. См. «Study of HCD122 (Lucatumumab) and Bendamustine Combination Therapy in CD40⁺ Rituximab-Refractory Follicular Lymphoma», Clinical Trials Feeds; доступ в интернете по протоколу передачи гипертекста: clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01275209 (последнее обновление 11 января 2011 года). Однако моноклональные антитела могут характеризоваться и агонистической активностью. Например, эффективность CD220, антитела к CD40, ограничена его слабым стимулирующим потенциалом. См. Adams, et al., «Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival», J Immunol. 174: 542-50 (2005).

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0006] Предложен способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента-человека, нуждающегося в таком лечении, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества полипептидного антитела, описанного в настоящем документе. В одном варианте осуществления настоящего изобретения аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Шегрена.

[0007] Способ предусматривает введение моноклонального антитела, направленного против эпитопа CD40, связанного с антагонистическим действием. В одном варианте осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело представляет собой BMS-986325. Раскрытые здесь антитела в значительной степени ингибируют передачу сигнала CD40 при пролиферации В-клеток, управляемого как растворимым CD40L, так и ассоциированным с клеткой CD40L. Кроме того, раскрытые здесь антитела ингибируют индуцированную CD40L передачу сигналов на DC, что приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов и снижению уровня маркеров активации клеточной поверхности, таких как CD86 и CD54. Раскрытые антитела полностью перекрестно реагируют с CD40 яванского макака, и лечение яванских макаков

раскрытыми здесь антителами приводит к дозозависимому взаимодействию с рецептором, снижению CD40L-управляемой активации В-клеток *ex vivo* и подавлению Т-клеточно-зависимого гуморального ответа (TDAR). Кроме того, раскрытые антитела содержат фрагмент кристаллизуемой (Fc) области, содержащей мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание с Fc-рецепторами, устраняя тем самым перекрестное связывание или кластеризацию, опосредованную Fc-гамма-рецептором (FcγR). Важно отметить, что раскрытые антитела не проявляют признаков агонизма в отношении CD40, что установлено в доклинических испытаниях *in vitro* и в испытаниях *in vivo*.

[0008] Способ по изобретению осуществляют путем введения пациенту по меньшей мере одной дозы выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с человеческим CD40, где антитело содержит первую полипептидную часть, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую полипептидную часть, содержащую вариабельную область легкой цепи, где:

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

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

где доза выбрана в диапазоне от 0,3 миллиграмма (мг) до 1000 мг антитела или его антигенсвязывающей части.

[0009] В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ выполняют на практике с использованием выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, где антитело содержит первую полипептидную часть, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую полипептидную часть, содержащую вариабельную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4), и

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10).

[0010] В некоторых вариантах осуществления способа по изобретению выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат первую полипептидную часть, содержащую константную область тяжелой цепи человека; и вторую полипептидную часть, содержащую константную область легкой цепи человека. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, содержат домен Fc IgG1 человека, содержащий мутацию в положении 238 по Kabat, которая снижает связывание с Fc-гамма-рецепторами (FcγR), где пролин 238 (P238) мутирован в один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана, и при этом антитело или его антигенсвязывающая часть имеют сниженную способность к связыванию FcγR. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пролин в положении 238 по Kabat заменен лизином.

[0011] Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут содержать домен Fc, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 13; IgG1-P238K (-C-концевой Lys)),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 14; IgG1-P238K),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTI***SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS**
*SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV***EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG****K**
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
*ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE***NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS**
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 15; CH1-IgG1-P238K (-C-
концевой Lys)),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTI***SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS**
*SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV***EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG****K**
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16; CH1-IgG1-P238K),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 17; IgG1f-P238K (-C-концевой Lys)),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18; IgG1f-P238K),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 19; CH1-IgG1f-P238K (-C-концевой Lys))

или

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No: 20; CH1-IgG1f-P238K).

[0012] Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть может содержать домен Fc IgG1 человека, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ выполняют на практике с использованием выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, где первая полипептидная часть содержит или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QI**
NPTTGRSQYNEKFKTRVITITADKSTSTAYMELSSLRSED~~T~~AVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~TV~~SWNSGALTSGVHTF~~P~~
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV~~EPK~~SCDKTHTCPPCPAPELL
 GG**K**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1-P238K - без концевого лизина),

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QI**
NPTTGRSQYNEKFKTRVITITADKSTSTAYMELSSLRSED~~T~~AVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~TV~~SWNSGALTSGVHTF~~P~~
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV~~EPK~~SCDKTHTCPPCPAPELL
 GG**K**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1-P238K - с концевым лизином),

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QI**
NPTTGRSQYNEKFKTRVITITADKSTSTAYMELSSLRSED~~T~~AVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~TV~~SWNSGALTSGVHTF~~P~~
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV~~EPK~~SCDKTHTCPPCPAPELL
 GG**K**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 21; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1f-P238K - без концевого лизина), и

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QI**
NPTTGRSQYNEKFKTRVITITADKSTSTAYMELSSLRSED~~T~~AVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT~~TV~~SWNSGALTSGVHTF~~P~~
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV~~EPK~~SCDKTHTCPPCPAPELL
 GG**K**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22; HC_Y12XX-hz28-CH1-IgG1f-P238K - с концевым лизином); и

вторая полипептидная часть содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAWAWYQQKPGKAPKLLIYSSASYR
YTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL).

[0014] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ выполняют на практике с использованием антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, где первая полипептидная часть содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQI
NPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTF
 AVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGKSVFLEFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRLWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K - без концевого лизина); и

вторая полипептидная часть содержит или состоит из аминокислотной последовательности:

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAWAWYQQKPGKAPKLLIYSSASYR
YTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL).

[0015] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ выполняют на практике с использованием антитела BMS-986325, где первая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQI
NPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTF

*AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-
CH1-IgG1-P238K - без концевого лизина); и*

вторая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность:

*DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR
YTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-
CL).*

[0016] В описанных здесь способах по изобретению выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут представлять собой химерное антитело. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут представлять собой гуманизированное антитело. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут содержать константную область тяжелой цепи человека и константную область легкой цепи человека.

[0017] В описанных здесь способах по изобретению выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут представлять собой антигенсвязывающую часть, выбранную из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, диател и scFv-Fc. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в настоящем документе, могут представлять собой scFv-Fc.

[0018] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны с терапевтическим средством.

[0019] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут быть связаны со вторым функциональным фрагментом, имеющим другую специфичность связывания, чем специфичность связывания указанных антитела или его антигенсвязывающей части.

[0020] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут также содержать дополнительный фрагмент.

[0021] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, необязательно вводят с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. Введение может быть одновременным или

последовательным. Примером такого средства является мутантная молекула CTLA4, такая как L104EA29Y-Ig (белатацепт). В таком способе лечения или профилактики аутоиммунного или воспалительного заболевания у субъекта, этот субъект имеет заболевание, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из: болезни Аддисона, аллергий, анафилаксии, анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, атопической аллергии, аутоиммунных заболеваний органов слуха, аутоиммунных заболеваний органов зрения, аутоиммунного гепатита, аутоиммунного паротита, бронхиальной астмы, коронарной болезни сердца, болезни Крона, сахарного диабета, эпидидимита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, болезни Хашимото, гемолитической анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпур, воспалительного заболевания кишечника, иммунной реакции на рекомбинантные лекарственные препараты (например, на фактор VII у лиц, страдающих гемофилией), волчаночного нефрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, пузырчатки, псориаза, ревматической атаки, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, синдрома Шегрена, спондилоартропатий, тиреоидита, отторжения трансплантата, васкулита и язвенного колита.

[0022] В настоящем изобретении также предлагается антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена. Кроме того, предлагается антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, или содержащее их лекарственное средство, для применения для лечения субъекта, нуждающегося в этом, например субъекта, у которого диагностирован синдром Шегрена. Кроме того, предлагается антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем документе, в терапевтически эффективном количестве для применения при лечении или профилактике аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена, где антитело или его антигенсвязывающая часть представлены в форме для введения пациенту, нуждающемуся в этом.

Краткое описание фигур

[0023] На Фигуре 1 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи BMS-986325.

[0024] На Фигурах 2A-2C представлено обобщение первичных фармакодинамических данных *in vitro* для BMS-986325. Сокращения: ADCC - антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCP - антителозависимый клеточный фагоцитоз; CD40L - лиганд CD40; CDC - комплементзависимая цитотоксичность; CHO -

клетки яичника китайского хомячка; DC - дендритные клетки; EC50 - концентрация, необходимая для 50% максимального эффекта; FcγR - рецептор Fcγ; IC50 - концентрация, при которой наблюдается 50% ингибирование; iDC - дендритные клетки, происходящие из моноцитов; IgG1 - иммуноглобулин G1; IL - интерлейкин; Kd - константа диссоциации; NA - неприменимо, нет данных; NK - естественные клетки-киллеры; SPR - поверхностный плазмонный резонанс.

[0025] На Фигуре 3 представлено обобщение первичных фармакодинамических данных *in vivo* для BMS-986325. Сокращения: CD40L - лиганд CD40; F - самка; KLH - гемоцианин лимфы улитки; M - самец; NA - неприменимо, нет данных; PD - фармакодинамика; RO - занятость рецептора; SK - подкожно.

[0026] На Фигуре 4 представлена схема повышения однократной возрастающей дозы (SAD) и соответствующие предполагаемые пределы безопасности и эффективности BMS-986325 для внутривенных доз SAD. Сокращения: AUC(INF) - площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до бесконечности; C_{max} - максимальная наблюдаемая концентрация; IV - внутривенно; MABEL - ожидаемая минимальная доза, оказывающая биологический эффект; NOAEL - уровень дозы без наблюдаемого вредного воздействия; RO - занятость рецептора; SAD - однократная возрастающая доза.

[0027] На Фигуре 5 показаны пределы безопасности для BMS-986325, рассчитанные на основе 1-месячного исследования GLP-токсикологии на обезьянах. Сокращения: AUC - площадь под кривой зависимости концентрации от времени; C_{max} - максимальная наблюдаемая концентрация; FIH - первый на людях; GLP - надлежащая лабораторная практика; INF - бесконечность; IV - внутривенно; NOAEL - уровень дозы без наблюдаемого вредного воздействия; SAD - однократная возрастающая доза; SC - подкожно; qw - один раз в неделю.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0028] Настоящее изобретение относится к способу лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена, у пациента-человека, предусматривающего введение антагонистических антител к CD40. В случае терапевтических мишеней, таких как CD40, FcγR-опосредованное перекрестное связывание антител против CD40 может потенциально приводить к нежелательной передаче сигналов агонистов и к потенциальной токсичности. В способах настоящего изобретения предусмотрено введение антагонистического антитела к CD40 со сниженной способностью к взаимодействию с «низкоаффинными» FcγR: hCD32a/FcγRIIa, hCD32b/FcγRIIb и hCD16a/FcγRIIIa, а также со сниженным взаимодействием с «высокоаффинным» FcγR hCD64. Ожидается, что

сниженная способность к взаимодействию с низкоаффинными Fc γ R обеспечит снижение вероятности нежелательной передачи сигналов с участием агонистов и нежелательной потенциальной токсичности.

Определения и сокращения

[0029] Ниже приведены дополнительные сокращения и определения.

APC - антигенпрезентирующие клетки

CD54 - также называемый ICAM-1

CDR - определяющие комплементарность области

C_H или CH - константная область тяжелой цепи

C_L или CL - константная область легкой цепи

Клетка CHO - клетка яичника китайского хомячка

dAb - однодоменное антитело

DC - дендритная клетка

DTPA - диэтилентриаминпентауксусная кислота

Fc γ R - взаимозаменяемо с Fc γ R

Fc γ R - Fc-гамма-рецептор

FR - каркасная область

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HC - тяжелая цепь

ICAM-1 - молекула 1 межклеточной адгезии

iDC - незрелые дендритные клетки

IFN - интерферон

IgG- иммуноглобулин G

IL-6 - интерлейкин-6

LC - легкая цепь

mAb - моноклональное антитело

мг - миллиграмм

мл - миллилитр

нг - нанограмм

нМ - наномолярный

Пентетиновая кислота - диэтилентриаминпентауксусная кислота

PD - фармакодинамика

pI - изоэлектрическая точка

PK - фармакокинетика

q2wk - раз в две недели

qwk - один раз в неделю

SPR - поверхностный плазмонный резонанс

TDAR - Т-клеточно-зависимый гуморальный ответ

TNF - фактор некроза опухоли

мкг - микрограмм

мкМ - микромолярный

V_L или VL - переменный домен легкой цепи

V_k или VK - переменный домен легкой каппа-цепи

V_H или VH - переменный домен тяжелой цепи

[0030] В рамках этого подробного описания настоящего изобретения используются указанные сокращения и следующие определения. Следует отметить, что в контексте настоящего документа формы единственного числа включают их множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «антитело» включает множество таких антител, а ссылка на «дозировку» включает ссылку на одну или несколько доз и их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т.д.

[0031] В контексте настоящего документа используемый термин «приблизительно» понятен специалистам в данной области, и он может до некоторой степени варьироваться в зависимости от контекста, в котором он применяется. Как правило, термин «приблизительно» охватывает диапазон значений, которые составляют плюс/минус 10% от упомянутого значения, если в настоящем описании не указано иное.

[0032] Следует понимать, что в настоящий документ включены любые целые числа или их дробные значения в пределах указанных численных диапазонов.

[0033] CD40 также известен, и он упоминается как поверхностный антиген В-клеток CD40, Bp50, рецептор CD40L, CDw40, CDW40, MGC9013, p50, TNFRSF5 и член 5 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. «CD40 человека» относится к CD40, содержащему следующую аминокислотную последовательность:

```

MVRLLPLQCVL  WGCLLTAVHP  EPPTACREKQ  YLINSQCCSL  CQPGQKLVSD
CTEFTETECL   PCGESEFLDT   WNRETHCHQH  KYCDPNLGLR  VQQKGTSETD
TICTCEEGRWH   CTSEACESCV   LHRSCSPGFG  VKQIATGVSD  TICEPCPVGF
FSNVSSAFEK    CHPWTSCETK   DLVVQQAGTN  KTDVVCQPQD  RLRALVVIPI
IFGILFAILL    VLVFIKKVAK   KPTNKAPHPK  QEPQEINFPD  DLPGSNTAAP
VQETLHGCQP   VTQEDGKESR  ISVQERQ (SEQ ID NO: 12).

```

[0034] Используемый здесь термин «вариабельный домен» относится к вариабельным доменам иммуноглобулина, определенным в Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th ed., U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991). Нумерация и положение аминокислотных остатков CDR в пределах вариабельных доменов представлены в соответствии с хорошо известной системой нумерации по Kabat. VH, «вариабельная тяжелая цепь» и «вариабельная область тяжелой цепи» относятся к вариабельному домену тяжелой цепи. VL, «вариабельная легкая цепь» и «вариабельная область легкой цепи» относятся к вариабельному домену легкой цепи.

[0035] Отсылка на термин «человек», применительно к антителам, означает, что антитело имеет последовательность, например, домена FR и/или домена CH, происходящую из иммуноглобулина человека. Последовательность «происходит из» последовательности, кодирующей иммуноглобулин человека, когда последовательность: (a) выделена из организма человека или из клетки или клеточной линии человека; (b) выделена из библиотеки последовательностей клонированных генов антител человека или последовательностей вариабельных доменов антител человека; или (c) диверсифицирована путем мутации и отбора из одного или нескольких полипептидов, указанных выше.

[0036] Используемый здесь термин «выделенное» в отношении какого-либо соединения означает, что соединение отделено по меньшей мере от одного компонента, с которым это соединение естественным образом связано в природных условиях.

[0037] Антитело к CD40 по настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, каждая из которых содержит три определяющих комплементарность области (CDR) и четыре каркасные области (FR), которые расположены от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR содержат большинство остатков, которые ответственны за специфические взаимодействия с антигеном, и в первую очередь они отвечают за распознавание антигена.

[0038] В способах по настоящему изобретению предусмотрено введение антитела к CD40, содержащего CDR гуманизированного антитела Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2) и домен Fc IgG1 человека, содержащий мутацию в положении 238 по Kabat, которая снижает связывание с Fc-гамма-рецепторами (FcγR). См. публикацию заявки на выдачу патента США № 2020/0157233. Обзор аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи представлен в Таблице 1. Таблица включает сокращенное название и более подробное название для

каждой аминокислотной последовательности, а также идентификаторы последовательностей.

Таблица 1

Антитело	Варибельная область HC	Варибельная область LC
Y12XX-hz28	Vh-hz14 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGL EWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWGLQPFAYWGQGTLLV TSS (SEQ ID NO: 4)	Vk-hz2 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITIT CKASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRYTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)

[0039] В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к CD40 по изобретению содержат CDR гуманизированного антитела Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2). Подробная информация об аминокислотных последовательностях Y12XX-hz28 представлена в Таблице 2.

Таблица 2

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

Варибельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY AFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQIN PTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAY WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 4)	Vh-hz14 (SEQ ID NO: 4; CDR подчеркнуты)
VH-CDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	Аминокислоты 31-35 SEQ ID NO: 4
VH-CDR2	QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2)	Аминокислоты 50-66 SEQ ID NO: 4
VH-CDR3	WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3)	Аминокислоты 99-106 SEQ ID NO: 4

HC_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K (представляет собой IgG1 с С-концевым лизином и без него)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY AFT<u>SYWMH</u>WVRQAPGQGLEWMG<u>QIN</u> <u>PTTGRSQYNEKFKT</u>RVTTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCAR<u>WGLOPFAY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGG<u>K</u>SVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5)	CDR подчеркнуты; CH1=аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1- P238K = аминокислоты 216- 446; P238K подчеркнута; без С- концевого лизина
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY AFT<u>SYWMH</u>WVRQAPGQGLEWMG<u>QIN</u> <u>PTTGRSQYNEKFKT</u>RVTTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCAR<u>WGLOPFAY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGG<u>K</u>SVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)	CDR подчеркнуты; CH1=аминокислоты 118-215 (выделены курсивом); IgG1- P238K = аминокислоты 216- 447; P238K подчеркнута; присутствует С-концевой лизин

Вариабельная область легкой цепи	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITC <u>KASQD</u> <u>VSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY</u> <u>IGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFAT YYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)	Vk-hz2 (SEQ ID NO: 10; CDR подчеркнуты)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7)	Аминокислоты 24-34 SEQ ID NO: 10
VL-CDR2	SASYRYT (SEQ ID NO: 8)	Аминокислоты 50-56 SEQ ID NO: 10
VL-CDR3	QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9)	Аминокислоты 89-97 SEQ ID NO: 10
LC_Y12XX-hz28	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITC <u>KASQD</u> <u>VSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY</u> <u>IGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS</u> SLQPEDFAT YYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIKRTAAA <i>PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</i> <i>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST</i> <i>YLSSTLACESPTLSKADYEKHKVY</i> (SEQ ID NO: 11)	CDR подчеркнуты; CL=аминокислоты 108-214 (выделены курсивом)

[0040] «Антитело» (Ab) должно включать, без ограничений, иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном, и который содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Каждая H-цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (обозначаемую здесь сокращенно как V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три константных домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (обозначаемую здесь сокращенно как V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один константный домен C_L. Области V_H и V_L могут быть дополнительно разделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

[0041] «Антигенсвязывающая часть» Ab (также называемая «антигенсвязывающим фрагментом») или его антигенсвязывающей часть относится к одной или нескольким последовательностям Ab (полноразмерного антитела или фрагмента полноразмерного антитела), которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связываемым полным Ab. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают Fab, F(ab')₂, scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab', dsFv, sc(Fv)₂ и scFv-Fc.

[0042] «Гуманизированное» антитело относится к Ab, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты, находящиеся за пределами доменов CDR антитела, не являющегося Ab человека, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулинов человека. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в гуманизированной форме Ab некоторые, большинство или все аминокислоты, находящиеся за пределами доменов CDR антитела, заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR остались без изменений. Допустимы небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, если они не устраняют способность Ab связываться с конкретным антигеном. «Гуманизированное» Ab сохраняет антигенную специфичность, аналогичную специфичности исходного Ab.

[0043] «Химерное антитело» относится к Ab, в котором вариабельные области происходят из одного вида, а константные области происходят из другого вида, например, в Ab вариабельные области могут происходить из Ab мыши, а константные области происходят из Ab человека.

[0044] Используемый здесь термин «специфическое связывание» относится к связыванию антигена антителом с константой диссоциации (K_d) приблизительно равной 1 мкМ или ниже, при измерении, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Подходящие системы анализа включают систему для осуществления метода поверхностного плазмонного резонанса BIAcore™ (GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс) и программное обеспечение для анализа кинетических данных BIAcore™ (например, версии 2.1).

[0045] Связывание антител настоящего изобретения с CD40 оказывает антагонистическое действие в отношении по меньшей мере одного типа активности CD40. «Активности CD40» включают, но без ограничения, активацию Т-клеток (например, индукцию пролиферации Т-клеток или секреции цитокинов), активацию макрофагов (например, индукцию выработки активных форм кислорода и оксида азота в макрофагах) и активацию В-клеток (например, пролиферацию В-клеток, переключение изотипа

антител или дифференцировку в тучные клетки). Типы активности CD40 могут быть опосредованы взаимодействием с другими молекулами. «Активности CD40» включают функциональное взаимодействие между CD40 и следующими молекулами, которые обозначены с помощью их номеров доступа в UniProt, которые указаны в скобках:

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

[0046] Например, «активность» CD40 включает взаимодействие с TRAF2. Взаимодействие CD40/TRAF2 активирует NF-κB и JNK (см. Davies et al., Mol. Cell Biol. 25: 9806-19 (2005)). Следовательно, такая активность CD40 может быть определена по CD40-зависимой клеточной активации NF-κB и JNK по сравнению с эталоном.

[0047] Используемые в настоящем документе термины «активировать», «активирует» и «активированный» относятся к повышению данной измеряемой активности CD40 по меньшей мере на 10% по сравнению с эталоном, например, по меньшей мере на 10%, 25%, 50%, 75%, или даже на 100% или более. Активность CD40 является «антагонистической», если активность CD40 снижается по меньшей мере на 10%, а в иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере приблизительно на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% или даже на 100% (т.е. отсутствие измеряемой активности) по сравнению с активностью при отсутствии антагониста. Например, антитело может оказывать антагонистическое действие в отношении некоторых или всех типов активности CD40, не активируя при этом CD40. Например, антитело может не активировать пролиферацию В-клеток. Антитело может не активировать секрецию цитокинов Т-клетками, где цитокин представляет собой

по меньшей мере один цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α и IFN- γ .

[0048] Вариабельные домены могут содержать одну или несколько каркасных областей (FR) с той же аминокислотной последовательностью, что и у соответствующей каркасной области, которая кодируется сегментом гена антитела зародышевой линии человека. Предпочтительными каркасными последовательностями для описанных здесь антител являются такие, которые структурно аналогичны каркасным последовательностям, применяемым в антителах, описанных в настоящем документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 из VH и последовательности CDR1, 2 и 3 из VL могут быть привиты к каркасным областям, которые имеют последовательность, идентичную последовательности, определенной в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть привиты к каркасным областям, которые содержат до 20 аминокислотных замен, предпочтительно консервативных, по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было установлено, что в некоторых случаях для поддержания или усиления антигенсвязывающей способности антитела полезно мутировать остатки в каркасных областях (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370, выданные на имя Queen et al.).

[0049] Типичные каркасные области известны в данной области техники и описаны в публикации заявки США № 2020/00157233. Примеры тяжелых и легких вариабельных цепей химерного антитела представлены в Таблице 8 раздела «Примеры» в публикации заявки США № 2020/00157233. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть может представлять собой гуманизированное антитело. Примеры гуманизированных тяжелых и легких вариабельных цепей представлены в Таблице 10 раздела «Примеры» в публикации заявки США № 2020/00157233.

[0050] Примеры иллюстративных антител против CD40 по настоящему изобретению включают выделенное антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с CD40 человека, причем указанное антитело содержит первую полипептидную часть, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, и вторую полипептидную часть, содержащую вариабельную область легкой цепи. где:

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

указанная переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9).

Домен Fc и константная область

[0051] Карбоксильно-концевая «половина» тяжелой цепи определяет константную область (Fc), и она в первую очередь отвечает за эффекторную функцию. Используемый здесь термин «домен Fc» относится к последовательностям константной области антител, содержащих константные домены CH2 и CH3, в соответствии с определениями, представленными в Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th ed., U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991). Область Fc может происходить из IgG человека. В одном варианте осуществления настоящего изобретения область Fc может происходить из переменного домена тяжелой цепи IgG1A человека, и она может быть слита с доменом Fc. Карбоксильный конец переменного домена может быть связан или слит с амино-концом CH2 домена Fc. Альтернативно, карбоксильный конец переменного домена может быть связан или слит с амино-концом линкерной аминокислотной последовательности, которая в свою очередь слита с амино-концом домена Fc. Альтернативно, карбоксильный конец переменного домена может быть связан или слит с аминоконцом домена CH1, который в свою очередь слит с CH2 домена Fc. Белок может необязательно содержать полностью или частично шарнирную область после домена CH1. Между переменным доменом и доменом Fc необязательно присутствует аминокислотная линкерная последовательность. Карбоксильный конец переменного домена легкой цепи может быть связан или слит с амино-концом домена CL.

[0052] Типовая последовательность CH1 тяжелой цепи представляет собой аминокислоты 118-215 SEQ ID NO: 5:

(ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV; SEQ ID NO: 23).

Типовой последовательностью CL легкой цепи представляет собой аминокислоты 108-214 SEQ ID NO: 11:

(RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC; SEQ ID NO: 24).

[0053] Антитело может представлять собой слитое антитело, содержащее первый переменный домен, который специфически связывается с CD40 человека, и второй домен, содержащий домен Fc.

[0054] Примеры доменов Fc, используемых в слитом белке, могут включать домены IgG1 человека. Хотя гены тяжелой цепи IgG человека кодируют С-концевой лизин, однако в эндогенных антителах лизин часто отсутствует в результате расщепления в кровотоке. Антитела, имеющие тяжелые цепи IgG, включающие С-концевой лизин, при экспрессии в культурах клеток млекопитающих также могут иметь различные уровни присутствия С-концевого лизина (Cai et al., 2011, Biotechnol. Bioeng. 108(2): 404-12). Соответственно, С-концевой лизин любого описанного здесь домена Fc тяжелой цепи IgG может отсутствовать.

[0055] Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, могут содержать домен Fc IgG1 человека, содержащий мутацию в положении 238 по Kabat, которая снижает связывание с Fc-гамма-рецепторами (FcγR), где пролин 238 (P238) мутирован путем замены на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина (K), серина (S), аланина (A), аргинина (R) и триптофана (W), и где антитело или его антигенсвязывающая часть имеют сниженную способность к связыванию FcγR. Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут иметь мутацию P238 в лизин в домене Fc IgG1 человека.

[0056] Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат домен Fc, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 13-20.

[0057] Примеры последовательностей, содержащих указанные выше домены Fc IgG1, включают: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22.

[0058] Выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые раскрыты в настоящем документе, могут представлять собой Y12XX-hz28-P238K, имеющее а) тяжелую цепь из SEQ ID NO: 5 или 6, и b) легкую цепь из SEQ ID NO: 11.

[0059] В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ по изобретению предусматривает введение антитела BMS-986325. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи BMS-986325 представлены на Фигуре 1. Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ по изобретению предусматривает введение выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, которые имеют тяжелую цепь из SEQ ID NO: 5, и легкую цепь из SEQ ID NO: 11. BMS-986325 содержит CDR гуманизированного антитела Y12XX-

hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2) и домен Fc IgG1 человека, содержащий лизин в положении 238 по Kabat (P238K).

[0060] BMS-986325 представляет собой антитело изотипа IgG1, содержащее новую мутацию P238K, которая была выполнена для исключения возможности связывания FcγR, с целью устранения передачи опосредованных Fc сигналов. Как и другие молекулы IgG, BMS-986325 состоит из двух HC и двух LC, ковалентно связанных дисульфидными связями. Полученный белок состоит из 1320 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 144867 Да. Мутация P238K расположена в нижней шарнирной области константного домена IgG1, как показано в первичной последовательности.

[0061] В неклинических исследованиях связывание BMS-986325 с CD40 мыши, человека и яванского макака, а также с различными FcγR оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). BMS-986325 также исследовали в тестах на антагонизм к CD40 как на В-клетках, так и на дендритных клетках, происходящих из моноцитов (iDC). BMS-986325 также оценивали на антагонизм в отношении выделенных В-клеток, а также WB В-клеток яванского макака. Кроме того, отсутствие какого-либо агонистического сигнала было подтверждено в анализах как на В-клетках человека, так и на В-клетках яванского макака, а также на незрелых DC человека. Для дальнейшего подтверждения отсутствия какой-либо агонистической активности BMS-986325 использовали высокочувствительный репортерный анализ CD40-NFκB. Обобщенные данные и результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, представлены соответственно на Фигурах 2А-2С и 3.

[0062] Антитело или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящем документе, характеризуются тем, что антигенсвязывающая часть выбрана из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc (Fv)₂, диател и scFv -Fc.

[0063] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут быть иммуноконъюгатами, где антитело или его антигенсвязывающая часть связаны с терапевтическим средством.

[0064] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, могут быть биспецифическим антителом, где антитело или его антигенсвязывающая часть связаны со вторым функциональным фрагментом, имеющим другую специфичность связывания, чем указанное антитело или его антигенсвязывающая часть.

[0065] Антитело или его антигенсвязывающая часть, раскрытые в настоящем документе, также могут содержать дополнительный фрагмент.

[0066] Вариабельные области антител настоящего изобретения могут быть необязательно соединены с доменом Fc с помощью «аминокислотного линкера» или «линкера». Например, С-конец вариабельного домена тяжелой цепи может быть слит с N-концом аминокислотного линкера, а домен Fc может быть слит с С-концом линкера. Хотя аминокислотные линкеры могут быть любой длины и состоять из любой комбинации аминокислот, однако для уменьшения взаимодействий между соединенными доменами длина линкера может быть относительно короткой (например, из пяти или менее аминокислот). Аминокислотный состав линкера также может быть скорректирован для уменьшения количества аминокислот с объемными боковыми цепями или аминокислот, которые могут формировать вторичную структуру. Подходящие аминокислотные линкеры включают, но без ограничения, линкеры длиной до 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 или 25 аминокислот. Репрезентативные аминокислотные линкерные последовательности включают GGGGS (SEQ ID NO: 25) и линкер, содержащий 2, 3, 4 или 5 копий GGGGS (соответственно SEQ ID NO: 26-29). В Таблице 3 перечислены подходящие линкерные последовательности для использования в настоящем изобретении.

Таблица 3

Репрезентативные линкерные последовательности

GGGGS	SEQ ID NO: 25
(GGGGS) ₂	SEQ ID NO: 26
(GGGGS) ₃	SEQ ID NO: 27
(GGGGS) ₄	SEQ ID NO: 28
(GGGGS) ₅	SEQ ID NO: 29
AST	SEQ ID NO: 30
TVAAPS	SEQ ID NO: 31
TVA	SEQ ID NO: 32
ASTSGPS	SEQ ID NO: 33

Получение антител

[0067] Антитело может быть получено и очищено на основании обычных знаний в данной области с использованием подходящей линии клеток-хозяев млекопитающего, такой как CHO, 293, COS, NSO и т.п., с последующей очисткой полученного антитела, используя для этого один или комбинацию известных методов, включая аффинную хроматографию с белком А, ионный обмен, методы с обращенной фазой и т.п.

[0068] Как хорошо известно в данной области, одну и ту же аминокислоту могут кодировать несколько кодонов. Таким образом, нуклеиновые кислоты, кодирующие белковую последовательность, включают нуклеиновые кислоты с вырожденными кодонами. Описанные в настоящем документе полипептидные последовательности могут кодироваться различными нуклеиновыми кислотами. Генетический код является универсальным, и он хорошо известен. Нуклеиновые кислоты, кодирующие любую полипептидную последовательность, описанную в настоящем документе, могут быть легко получены на основе общепринятых знаний в данной области, а также они могут быть оптимизированы для получения продукта. Несмотря на то, что возможное количество последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих данный полипептид, достаточно велико, однако при наличии стандартной таблицы генетического кода и при помощи компьютера специалист в данной области может легко создать любую возможную комбинацию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих заданный полипептид.

[0069] Типовая иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный домен тяжелой цепи BMS-986325, включая константную область CH1 и домен Fc IgG1-P238K, представляет собой следующую последовательность:

```
ATGAGGGCTT GGATCTTCTT TCTGCTCTGC CTGGCCGGGA GAGCGCTCGC
ACAGGTGCAG CTGGTGCAGT CTGGTGCCGA GGTCAAAAAG CCAGGCTCCA
GCGTGAAGGT GAGCTGCAAG GCCTCTGGCT ACGCTTTCAC CTCTTATTGG
ATGCACTGGG TGAGACAGGC TCCTGGACAG GGCCTGGAGT GGATGGGCCA
GATCAACCCA ACCACCGGCA GAAGCCAGTA CAATGAGAAG TTAAAGACCC
GCGTGACCAT CACAGCCGAC AAGTCCACCA GCACAGCTTA TATGGAGCTG
TCTTCCCTGA GGTCCGAGGA TACAGCCGTG TACTATTGCG CTCGGTGGGG
CCTGCAGCCT TTCGCTTACT GGGGCCAGGG CACCCTGGTG ACAGTGAGCT
CTGCTAGCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG
AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT
CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG
TGCACACCTT CCCGGCCGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC
AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGC
CCAAATCTTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
CTCCTGGGGG GAAAGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC
CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA
```

GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG
 GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA
 CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA
 AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC
 CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT
 GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC
 AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC
 CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
 GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTT GA (SEQ ID NO: 34).

В этой последовательности нуклеотиды 1–51 кодируют сигнальный пептид (необязательный), нуклеотиды 52–402 кодируют переменную область тяжелой цепи, где нуклеотиды 141–155 кодируют CDR1, нуклеотиды 198–249 кодируют CDR2, а нуклеотиды 346–369 кодируют CDR3 переменного домена тяжелой цепи Y12XX. Нуклеотиды 403–696 кодируют домен CH1, а нуклеотиды 697–1399 кодируют IgG1-P238K. Нуклеотиды 1400–1402 являются стоп-кодоном.

[0070] Типовая иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая переменный домен легкой цепи BMS-986325, включая константную область CL, представляет собой следующую последовательность:

ATGAGGGCTT GGATCTTCTT TCTGCTCTGC CTGGCCGGGC GCGCCTTGGC
 CGACATCCAG ATGACCCAGT CCCCTCCTT CCTGTCTGCC TCCGTGGGCG
 ACAGAGTGAC CATCACCTGT AAGGCTTCCC AGGATGTGAG CACAGCCGTG
 GCTTGGTACC AGCAGAAGCC AGGCAAGGCC CCCAAGCTGC TGATCTATTC
 CGCCTCTTAC AGGTATACCG GCGTGCCCTC TCGGTTCTCC GGCAGCGGCT
 CTGGCACAGA CTTTACCCTG ACAATCTCCA GCCTGCAGCC TGAGGATTTT
 GCCACCTACT ATTGCCAGCA GCACTACTCC ACCCATGGA CATTTGGCGG
 CGGCACCAAG GTGGAGATCA AGCGTACGGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG
 TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT
 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAG
 (SEQ ID NO: 35).

В этой последовательности нуклеотиды 1–51 кодируют сигнальный пептид (необязательный), нуклеотиды 52–372 кодируют вариабельную область легкой цепи, где нуклеотиды 121–153 кодируют CDR1, нуклеотиды 199–219 кодируют CDR2, а нуклеотиды 316–342 кодируют CDR3. Нуклеотиды 373–693 кодируют CL. Нуклеотиды 694–696 являются стоп-кодоном.

[0071] Кодирующие последовательности тяжелой и/или легкой цепи могут необязательно кодировать сигнальный пептид, такой как MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO: 36), на 5'-конце кодирующей последовательности. Как описано выше, типовая иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая этот сигнальный пептид, представляет собой

ATGAGGGCTT GGATCTTCTT TCTGCTCTGC CTGGCCGGGA GAGCGCTCGC A
(SEQ ID NO: 37).

[0072] Соответственно, в настоящем изобретении также предложена нуклеиновая кислота, кодирующая описанное здесь антитело. Такая нуклеиновая кислота может быть встроена в вектор, такой как подходящий вектор экспрессии, например pHEN-1, для экспрессии в изолированной клетке (Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137). Кроме того, в настоящем изобретении также предложена выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор и/или нуклеиновую кислоту.

[0073] Антитело по изобретению может быть получено и очищено на основе обычных знаний в данной области с использованием любой подходящей линии клеток-хозяев млекопитающих, такой как клетки CHO (клетки яичника китайского хомячка), клетки 293 (клетки эмбриональной почки человека 293), клетки COS, клетки NSO и т.п., с последующей очисткой одним или комбинацией методов, включая аффинную хроматографию с белком А, ионный обмен, методы с обращенной фазой и т.п.

Фармацевтические композиции и способы лечения

[0074] Фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или нескольких антител и необязательно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность слитого белка. Состав композиции может быть оптимизирован таким образом, чтобы обеспечить быстрое, пролонгированное или

отсроченное высвобождение активного ингредиента (ингредиентов) после введения. Подходящие фармацевтические композиции и способы их получения известны в данной области (см., например, Remington, THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, A. Gennaro et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co. (2005)).

[0075] В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в настоящем документе, в виде композиции, содержащей гистидин, сахарозу, пентетиновую кислоту и полисорбат. В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит 150 мг/мл антитела, 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 50 мкмоль пентетиновой кислоты и 0,05% (масс./об.) полисорбата 80, pH 6,0. Композицию может быть забуферена ацетатно-натриевым буфером или фосфатно-натриевым буфером. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит или состоит из 150 мг/мл BMS-986325, 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 50 мкмоль пентетиновой кислоты и 0,05% (масс./об.) полисорбата 80, pH 6,0.

[0076] Фармацевтическую композицию можно вводить отдельно или в рамках комбинированной терапии (т.е. одновременно или последовательно) с иммуносупрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. Типичным примером такого средства является мутантная молекула цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4). Типовой мутантной молекулой CTLA4 является L104EA29Y-Ig (белатацепт), которая представляет собой модифицированный CTLA4-Ig. Различные иммунные заболевания могут потребовать использования специфических вспомогательных соединений/средств, полезных для лечения иммунных заболеваний, которые могут определяться для каждого пациента индивидуально. Например, фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими подходящими вспомогательными средствами, например, с цитокинами (например, IL-10 и IL-13) или с другими иммуностимуляторами, например хемокинами, опухолеассоциированными антигенами и пептидами. Подходящие вспомогательные средства известны в данной области.

[0077] Способ лечения иммунопатологического заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, может предусматривать введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе. В рамках настоящего изобретения также предложено применение антитела или его антигенсвязывающей части для лечения аутоиммунного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, и/или для лечения или

профилактики аутоиммунного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении, где предусматривается введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части. Антагонистическое действие в отношении CD40-опосредованной активации Т-клеток может ингибировать нежелательные Т-клеточные ответы, возникающие при аутоиммунном ответе. Ингибирование CD40-опосредованной активации Т-клеток может замедлить прогрессирование и/или тяжесть этих заболеваний.

[0078] Настоящее изобретение также предлагает применение антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению при получении лекарственного средства для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания у пациента, нуждающегося в таком лечении. Лекарственное средство можно вводить, например, в комбинации с иммунодепрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством.

[0079] Используемый здесь термин «пациент» означает животное, например млекопитающее, включая человека. В способе по изобретению у пациента может быть диагностировано аутоиммунное заболевание. Термины «лечение» или «лечить» относятся к процессу, включающему снижение прогрессирования или облегчение тяжести симптома, расстройства, состояния или заболевания. «Иммунное заболевание» относится к любому заболеванию, связанному с развитием иммунной реакции у индивидуума, включая клеточную и/или гуморальную иммунную реакцию. Примеры иммунных заболеваний включают, но без ограничения, воспаление, аллергию, аутоиммунное заболевание или заболевание, связанное с трансплантацией. В настоящем изобретении способ направлен на лечение аутоиммунного заболевания. «Аутоиммунное заболевание» относится к любому заболеванию, связанному с развитием аутоиммунной реакции у индивидуума, включая клеточную и/или гуморальную иммунную реакцию. Примером аутоиммунного заболевания является синдром Шегрена. Способ по изобретению также направлен на лечение первичного синдрома Шегрена (pSS) и вторичного синдрома Шегрена. Другие аутоиммунные заболевания включают воспалительное заболевание кишечника (IBD), включая, помимо прочего, язвенный колит и болезнь Крона, а также системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, рассеянный склероз (MS), ревматоидный артрит (RA), диабет, псориаз, склеродермию и атеросклероз.

[0080] Фармацевтическую композицию можно вводить отдельно или в рамках комбинированной терапии (т.е. одновременно или последовательно) с иммуносупрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством. Различные аутоиммунные заболевания могут потребовать применения специфических вспомогательных соединений, пригодных для лечения аутоиммунных заболеваний,

которые можно определить для каждого пациента отдельно. Например, фармацевтическую композицию можно вводить в комбинации с одним или несколькими подходящими адъювантами, например, с цитокинами (например, IL-10 и IL-13) или с другими иммуностимуляторами, например хемокинами, опухолеассоциированными антигенами и пептидами. Подходящие адъюванты известны в данной области.

[0081] Для введения антитела или его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции можно использовать любой подходящий способ или путь введения. Пути введения включают, например, внутривенное (IV), внутривентральное, подкожное (SC) или внутримышечное введение. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающую часть или фармацевтическую композицию вводят подкожно или внутривенно.

[0082] Частота введения зависит от множества факторов, включая, например, тип и тяжесть аутоиммунного заболевания, подлежащего лечению, использование комбинированной терапии, способа введения антитела или его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, а также массу тела пациента. Полипептидное антитело можно вводить ежедневно, еженедельно, раз в две недели (один раз каждые 2 недели), каждые 2-3 недели, каждые 3-4 недели или ежемесячно. Продолжительность лечения также зависит от множества факторов. Лечение может включать единственную дозу, или одну или несколько доз. Лечение можно проводить регулярно в течение недель, месяцев или лет, или спорадически, по мере необходимости.

[0083] Режим дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один раз в виде болюса, можно вводить несколько доз разделенных во времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена по мере необходимости с учетом ответа на лечение. Для простоты введения и однородности дозировки имеет смысл оптимизировать состав фармацевтических композиций с учетом требований для внутривенного (IV), внутривентрального, подкожного (SC) или внутримышечного введения, и фармацевтическую композицию представлять в виде удобной единичной дозированной формы. Единичная дозированная форма, как используется здесь, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для введения субъектам, подлежащих лечению; при этом каждая единичная доза содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

[0084] «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет

собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, подтверждаемое уменьшением тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов течения заболевания или предотвращению ухудшения состояния или нарушений функций из-за болезни. Терапевтически эффективная доза вводимого антитела зависит от множества факторов, включая, например, тип и тяжесть аутоиммунного заболевания, подлежащего лечению, использование комбинированной терапии, способ введения антитела или его антигенсвязывающей части или фармацевтической композиции, и массу тела пациента. Неограничивающий диапазон терапевтически эффективного количества моноклонального антитела к CD40 составляет 0,1-20 мг/кг (мг/кг) и, в одном аспекте, 1-10 мг/кг по отношению к массе тела пациента.

[0085] Неограничивающий диапазон терапевтически эффективного количества моноклонального антитела к CD40, где переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR1, содержащую SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащую QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), и CDR3, содержащую WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3), и переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASYRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9); и (ii) домен Fc IgG1 человека, содержащий мутацию в положении 238 по Kabat, которая снижает связывание с Fc-гамма-рецепторами (FcγR), составляет от 0,3 миллиграмма (мг) до 1000 мг при внутривенном (IV) введении и от 100 мг до 1000 мг для подкожного (SC) введения.

[0086] В одном варианте осуществления настоящего изобретения введение может быть внутривенным (IV), и при этом величина дозы составляет от 0,3 до 1000 миллиграммов (мг) полипептидного антитела. Доза может быть выбрана из 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 150, 300, 600 или 1000 мг полипептидного антитела. Способ может включать более одного повторения стадии введения. Способ может включать внутривенное (IV) введение, где доза составляет от 100 до 600 мг полипептидного антитела, и при этом способ предусматривает по меньшей мере четыре повторения стадии введения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения дозирование осуществляется один раз в неделю (QW) по меньшей мере в четырех повторениях стадии введения. Например, дозу 100 мг, 150 мг, 200 мг или 300 мг вводят один раз в неделю по меньшей мере в четырех повторениях стадии введения. В другом варианте дозирование проводят один раз каждые две недели (q2wk) по меньшей мере в двух повторениях стадии введения. Например, дозу 200 мг, 300 мг, 400 мг или 600 мг вводят пациенту каждые две недели по меньшей мере в

двух повторениях. В варианте осуществления настоящего изобретения начальная доза выше, чем последующие дозы. Например, начальная доза составляет 300 мг, а последующие дозы составляют 100 мг.

[0087] Примеры внутривенных (IV) доз включают, но без ограничения, 0,1 мг, 0,5 мг, 0,8 мг, 1 мг, 3 мг, 10 мг, 30 мг, 50 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 270 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 320 мг, 340 мг, 360 мг, 380 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг, 620 мг, 640 мг, 660 мг, 680 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг и 1000 мг полипептидного антитела. Примеры внутривенных (IV) доз включают, но без ограничения, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг, 800 мг, 900 мг и 1000 мг полипептидного антитела. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой BMS 986325. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза для внутривенного введения составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вводимая еженедельно (qwk) доза для внутривенного введения составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза для внутривенного введения составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг, которую вводят еженедельно (qwk) в течение по меньшей мере 4 недель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения внутривенная доза BMS 986325 составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вводимая еженедельно (qwk) внутривенная доза BMS 986325 составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения внутривенная доза BMS 986325 составляет от 75 до 100 мг, или 90 мг, которую вводят еженедельно (qwk) в течение по меньшей мере 4 недель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения внутривенная доза BMS 986325 составляет от 150 до 200 мг, или 180 мг, которую вводят раз в две недели в течение по меньшей мере 4 недель.

[0088] В одном варианте осуществления настоящего изобретения введение осуществляют подкожно (SC), и доза составляет от 100 до 1000 мг полипептидного антитела. Доза может быть выбрана из 100 мг, 300 мг, 600 мг или 1000 мг полипептидного антитела. Способ может включать более одного повторения стадии введения. Способ может включать подкожное введение, и при этом дозу выбирают в диапазоне от 100 до 600 мг, например, 100, 300 или 600 мг полипептидного антитела. В одном варианте осуществления настоящего изобретения начальная доза выше, чем последующие дозы.

[0089] Примеры диапазона доз для подкожного введения включают, но без ограничения, диапазоны от 50 мг до 1000 мг, от 50 мг до 750 мг, от 75 мг до 700 мг, от 100 мг до 1000 мг, от 100 мг до 600 мг, от 150 мг до 1000 мг, от 150 мг до 600 мг, от 300 мг до 600 мг, от 100 мг до 150-300 мг и от 150 мг до 300-600 мг антитела. Дозы для подкожного введения включают, но без ограничения, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 270 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг и 1000 мг полипептидного антитела. Примеры доз для подкожного введения включают, но без ограничения, 100 мг, 150 мг, 240 мг, 250 мг, 300 мг и 600 мг полипептидного антитела. В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой BMS 986325. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза для подкожного введения составляет от 200 до 300 мг, или 240 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза для подкожного введения составляет от 200 до 300 мг, или 240 мг, которую вводят один раз в две недели (q2wk). В одном варианте осуществления настоящего изобретения дозу 100 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель, или дозу 300 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель, или дозу 600 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза BMS 986325 для подкожного введения составляет от 200 до 300 мг, или 240 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза BMS 986325 для подкожного введения составляет от 200 до 300 мг или 240 мг, и ее вводят один раз в две недели (q2wk). В другом варианте осуществления настоящего изобретения дозу BMS 986325 100 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель, или дозу BMS 986325 300 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель, или дозу BMS 986325 600 мг для подкожного введения вводят еженедельно в течение по меньшей мере 4 недель или подкожную дозу 600 мг BMS 986325 вводят один раз в две недели в течение по меньшей мере 4 недель.

[0090] Доза полипептидного антитела (антител) может дополнительно зависеть от количества полипептидного антитела (антител), необходимого для антагонизма в отношении CD40 в моделях патологических состояний *in vitro* и/или *in vivo*. Репрезентативные модели описаны ниже в Примерах.

Наборы

[0091] Настоящее изобретение предлагает набор, пригодный для лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена, у пациента-человека. Набор может содержать (а) дозу антитела или его антигенсвязывающей части по изобретению и (b) инструктивный материал по применению антитела или его антигенсвязывающей части в способе лечения иммунного заболевания, или по применению антитела или его антигенсвязывающей части в способе лечения или профилактики аутоиммунного или воспалительного заболевания у пациента. Например, антитело или его антигенсвязывающая часть может представлять собой BMS 986325. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза находится в диапазоне от 1 миллиграмма (мг) до 1000 мг. В одном варианте осуществления настоящего изобретения доза антитела BMS-986325 представлена в композиции, содержащей 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 50 мкмоль пентетиновой кислоты и 0,05% (масс./об.) полисорбата 80, pH 6,0. Композиция может также содержать натрий-ацетатный буфер или натрий-фосфатный буфер.

[0092] Термин «инструктивный материал», как используется в настоящем документе, включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство представления сведений, которое можно использовать для информирования о применении композиции и/или соединения по изобретению, представленного в наборе. Инструктивный материал набора может быть, например, прикреплен к контейнеру или находиться внутри набора или контейнера, который содержит соединение и/или композицию по изобретению, или может поставляться вместе с контейнером, который содержит соединение и/или композицию. В качестве альтернативы, инструктивный материал может поставляться отдельно от контейнера, и потребитель будет использовать вместе инструктивный материал и соединение. Доставка инструктивного материала может осуществляться, например, путем физической доставки публикации или другого средства представления сведений, сообщающего о применении набора, или, в качестве альтернативы, доставка инструктивного материала может быть осуществлена в электронном виде, например, с помощью компьютера по электронной почте, или она может быть скачана с веб-сайта.

Примеры

Пример 1. Кинетика связывания с CD40 человека и яванского макака

[0093] Кинетика и аффинность связывания BMS-986325 с CD40 человека и CD40 яванского макака были охарактеризованы с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), путем захвата BMS-986325 на поверхности сенсорного чипа с

иммобилизованным белком А и тестирования связывания нескольких концентраций мономерного CD40 человека или CD40 яванского макака, используемых в качестве аналита. Установлено, что BMS-986325 связывается с CD40 человека с константой диссоциации (K_d) равной 5,3 нМ, и с CD40 яванского макака с K_d равной 6,7 нМ (см. Таблицу 4). BMS-986325 также тестировали в отношении связывания с CD40 мыши и CD40 крысы в одноцикловом кинетическом анализе SPR, где BMS 986325 показал сильное связывание с поверхностными CD40 человека и CD40 яванского макака; при этом не наблюдали на детектируемом уровне связывания с CD40 мыши и с CD40 крысы (данные не показаны).

Таблица 4

Оценка свойств BMS-986325 в отношении связывания CD40 в качестве мишени с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Мишень	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (нМ)
CD40 человека	$2,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-3}$	5,3
CD40 яванского макака	$2,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^{-3}$	6,7

Пример 2. Связывание с FcγR

[0094] BMS-986325 содержит новый изотип IgG1-P238K, который был разработан для уменьшения связывания с FcγR и FcγR2, или с FcγR яванского макака (суCD32a, суCD32b, суCD16). См. Таблицу 5. Кроме того, связывание BMS-986325 с высокоаффинным CD64 человека или с FcγR CD64 яванского макака было более чем в 100 раз слабее, чем связывание контрольного IgG1 человека дикого типа (см. Таблицу 5).

Таблица 5

Свойства BMS-986325 в отношении связывания с FcγR

FcγR	IgG1 K_d (нМ)	BMS-986325 K_d (нМ)
hCD64	< 0,1	17
hCD32a-H131	446	NB
hCD32a-R131	665	NB
hCD32b	3090	NB
hCD16a-V158	119	NB
hCD16a-F158	4430	NB
суCD64	< 0,1	13
суCD32a	1520	NB
суCD32b	877	NB

FcγR	IgG1 Kd (нМ)	BMS-986325 Kd (нМ)
cyCD16	164	NB

NB - ниже детектируемого уровня

Пример 3. Обобщенные данные и результаты по неклинической фармакокинетической оценки BMS-986325

[0095] Фармакокинетику (PK) BMS-986325 (Y12XX-hz28-P238K) оценивали на мышах и яванских макаках. Поскольку BMS-986325 не реагирует перекрестно с рецепторами CD40 мышей, то PK, оцененная на мышах, является внутренней или неспецифической PK. Поскольку BMS-986325 перекрестно реагирует с рецепторами CD40 обезьян, то общую PK (специфическую и неспецифическую PK) оценивали у обезьян. После внутривенного (IV) введения BMS-986325 (однократно в дозах 1 и 10 мг/кг) мышам, BMS-986325 показал низкий общий сывороточный клиренс «CLT» от 0,5 до 1,02 мл/сутки/кг, ограниченный объем распределения в равновесном состоянии «Vss» от 0,12 до 0,19 л/кг и длительный кажущийся период полувыведения «T-HALF» от 118 до 183 часов (~ 5-8 дней).

[0096] Обезьянам вводили однократную подкожную (SC) дозу (10 мг/кг) BMS-986325. Вводимая доза представляет собой дозу, при которой специфический клиренс (мишень-опосредованное распределение лекарственного средства «TMDD») не достигает насыщения. После однократного подкожного введения BMS-986325 хорошо всасывался с абсолютной биодоступностью 70,4% (по сравнению с той же внутривенной дозой). После внутривенного введения обезьянам BMS-986325 (однократная доза 10 мг/кг), для BMS-986325 определили ряд показателей: CLT 0,41 мл/день/кг, ограниченный Vss 0,05 л/кг и T-HALF 100 часов (~4 дня). После однократного подкожного введения обезьянам дозы BMS-986325 (вводимые дозы 1, 10 и 100 мг/кг) время достижения максимальной концентрации в плазме «Tmax» составило от 24 до 54 часов. Наблюдали более чем дозопропорциональное повышение воздействия (максимальная концентрация «Cmax» и площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированная по времени от нуля до бесконечности «AUC[INF]»), и повышение T-HALF по мере увеличения доз (~31, ~119 и ~197 часов соответственно при дозах 1, 10 и 100 мг/кг). Эти данные свидетельствуют о нелинейной PK и насыщаемом характере клиренса, что, вероятно, является результатом мишень-(CD40)-опосредованного клиренса, отражающего TMDD. В этом исследовании фармакокинетики с однократной дозой установили, что образование антилекарственных антител (ADA) имело место у ~50% обезьян, но оно не оказывало явного влияния на общие параметры фармакокинетики.

[0097] Фармакокинетическое/фармакодинамическое моделирование (модель TMDD с допущением квазистационарного состояния (TMDD-Qss)) использовали для описания нелинейной фармакокинетики, наблюдаемой у обезьян, установления взаимосвязи между действием лекарственного средства в сыворотке и занятостью рецепторов (RO) CD40 и для последующего прогнозирования дозы, применимой для человека.

Пример 4. Фармакокинетическое/фармакодинамическое моделирование на основе данных исследования с однократной дозой на обезьянах (исследование DN18016) и прогноз фармакокинетики и эффективной дозы для человека

[0098] Для описания нелинейной PK, наблюдаемой у обезьян, и установления связи между воздействием лекарственного средства в сыворотке и RO CD40 использовали моделирование PK/PD. BMS-986325 показал нелинейный характер PK (более чем дозопропорциональное повышение воздействия и увеличение T-HALF с ростом дозы), что является характеристиками насыщаемого механизма клиренса, следующего из TMDD. Для описания нелинейной фармакокинетики BMS-986325, наблюдаемой у обезьян, использовали модель мишень-опосредованного распределения лекарственного средства с допущением квазистационарного состояния (TMDD-Qss) для оценки неспецифического (линейного) и специфического или опосредованного CD40-мишенью-(нелинейного) процессов клиренса. Концентрации лекарственного средства и данные по RO, полученные от обезьян, одновременно подгоняли к модели PK/PD. Кривые, адаптированные к модели, которые описывают профили PK и RO, показали, что опосредованное рецептором CD40 связывание и показатели связывания ответственны за нелинейную фармакокинетику (PK) BMS-986325.

[0099] Фармакокинетику (PK) BMS-986325 у человека предсказывали с использованием той же модели PK/PD, которая использовалась для описания PK и RO BMS-986325 у обезьян. Для предсказания PK-параметров у человека в расчетах использовали показатели CLT, Vss и T-HALF для BMS-986325 у обезьян в отсутствие TMDD. Для неспецифической элиминации или линейного клиренса, компонент, полученный с помощью модели неспецифического клиренса у обезьян (0,34 мл/ч/кг), аллометрически масштабировали до значений у людей (0,23 мл/ч/кг), используя для этого показатель степени равный 0,85. Показатель Vss у человека (0,08 л/кг) также был аллометрически предсказан на основании данных, полученных от обезьян (0,08 л/кг), с использованием показателя степени равного 1. Показатель T-HALF у человека был рассчитан как равный 13 дням (10 дней у обезьян). Предполагали, что показатель TMDD у

людей такой же, как и у обезьян. Предполагали, что биодоступность BMS-986325 после подкожного введения у людей такая же, как у обезьян.

[0100] Предполагая, что между обезьяной и человеком существует одинаковая взаимосвязь PK/PD, и на основании расчетных параметров PK человека и минимальных концентраций в плазме в стационарном состоянии от 0,03 до 0,4 мкМ, прогнозировали эффективные дозы BMS-986325 у людей для достижения RO 90%, 95% и 99%, (см. Таблицу 6). Полное KLN-опосредованное подавление TDAR было достигнуто при RO >95% для BMS-986325 у обезьян и для BMS-986090 у людей.

Таблица 6

Прогнозируемые эффективные дозы BMS-986325 для человека

Занятость рецептора	Прогнозируемая эффективная доза для подкожного введения BMS-986325 человеку ^(a)	
	Каждую неделю	Каждые 2 недели
90%	66 мг	275 мг
95%	90 мг	240 мг
99%	180 мг	775 мг

^(a) - для нормального здорового человека с массой тела 70 кг.

Пример 5. Клиническое исследование BMS-986325 на людях

[00101] В протоколе клинического испытания, озаглавленном «Клинический протокол IM039-004. Двойное слепое, плацебо-контролируемое, рандомизированное с однократной и многократной дозой исследование безопасности, фармакокинетики и фармакодинамики при подкожном и внутривенном введении BMS-986325 у здоровых участников и участников с первичным синдромом Шегрена» подробно описан ход и результаты клинических испытаний, и он прилагается к настоящей заявке. Выдержки из протокола представлены ниже.

[00102] На сегодняшний день BMS-986325 еще не вводят людям. Предлагаемое первое исследование на людях (FIH) для BMS-986325 будет включать внутривенное и/или подкожное введение одной дозы и многократное введение возрастающей дозы (SAD и MAD) по комбинированному протоколу лицам, входящим в плацебо-контролируемую группу здоровых участников (части A и B), и группе лиц с первичным синдромом Шегрена (часть C). Целью этого начального исследования является оценка безопасности, переносимости, PK, PD (например, ответ биомаркера), иммуногенности, биодоступности и болезнетворных эффектов применения BMS-986325 с использованием доз и

продолжительности дозирования, руководствуясь начальной программой в отношении токсикологии, и учитывая данные, полученные в результате этого исследования.

[00103] Предлагаемая начальная доза SAD и максимальная доза будут составлять 0,3 мг и 1000 мг соответственно, что подтверждается результатами в отношении ожидаемой минимальной дозы, оказывающей биологический эффект (MABEL), фармакологически активной дозы (PAD) и NOAEL. Решения о повышении дозы будут основываться на оценке имеющихся результатов, полученных в соответствующих группах, включая результаты по безопасности и переносимости, результаты клинко-лабораторных оценок и, возможно, при наличии данных в отношении PK, PD и целевом воздействии. Если профиль BMS-986325 будет способствовать дальнейшим исследованиям и разработкам, то будут запланированы исследования с участием лиц с некоторыми иммуноопосредованными заболеваниями.

Диапазон дозирования для человека и пределы безопасности

[00104] В рамках исследования BMS-986325 на фазе 1 FII (SAD и MAD) предлагается выполнить оценку с привлечением здоровых участников (части A и B) и участников с синдромом Шегрена (фаза 1b, часть C). Предлагаемые диапазоны доз для оценки в части исследования SAD (часть A) составляют 0,3–1000 мг (9 уровней доз) при внутривенном введении (см. Фигуру 4). В части исследования MAD (часть B) оценка будет выполнена при еженедельных подкожных инъекциях доз 100, 300 и 600 мг, вводимых в течение 4 недель. Дозы, используемые в Части C не будут превышать уровень безопасное воздействия при SAD/MAD, и при этом продолжительность введения доз будет ограничена 4 неделями при частота введения доз не чаще одного раза в неделю.

Выбор начальной дозы BMS-986325 для исследования FII

[00105] Основная цель клинического исследования FII (IM039-004) состоит в том, чтобы охарактеризовать безопасность и переносимость SAD и MAD доз BMS-986325 у здоровых участников (части A и B) и многократных доз у участников с синдромом Шегрена (часть C).

[00106] Для выбора начальной дозы используются подходы MABEL («минимальная доза, оказывающая биологический эффект») и NOAEL («уровень дозы без наблюдаемых побочных эффектов»). Дозу MABEL определяют как дозу, при которой максимальное значение RO CD40 в WB человека составляет приблизительно 40%. Ожидается, что начальная внутривенная доза 0,3 мг обеспечит RO CD40 равное 39,5% при Cmax. Ожидается, что на этом уровне RO фармакологическая активность будет

минимальной, основываясь на *ex vivo* результатах в отношении CD40L-управляемой активации В-клеток (CD86), а также на результатах KLH-индуцированного TDAR, полученных в исследовании PK/PD у яванских макаков с использованием однократной дозы. Кроме того, предыдущие клинические исследования с антителом dAb BMS-986090 против CD40 показало, что при подкожных дозах 3 и 10 мг достигалось максимальное достижение RO, равное соответственно 8% и 42%. Поскольку ни при одном уровне занятости поверхностных рецепторов (RO) не наблюдали ингибирования TDAR (Т-клеточно-зависимого ответа антител), то маловероятно, что предлагаемая начальная внутривенная доза, равная 0,3 мг, которая, как предполагается, обеспечит RO на уровне 39,5% (при C_{max}), вызовет триггерную реакцию по какому-либо подавлению TDAR.

[00107] Одномесечное исследование токсичности на обезьянах при еженедельных дозах до 100 мг/кг, вводимых внутривенно (IV), показало, что BMS-986325 хорошо переносился при всех дозах с эффектами, соответствующими его фармакологии (см. Фигуру 5). На основании результатов этого исследования следует, что NOAEL составит 100 мг/кг при внутривенном введении. Прогнозируемые величины C_{max} и AUC(INF) (площадь под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированной от нулевого времени до бесконечности после внутривенного введения начальной дозы (0,3 мг), составят соответственно 0,09 мкг/мл и 0,57 мкг·ч/мл, исходя из прогнозируемой PK у человека (Фигура 5). Предполагается, что начальная доза 0,3 мг BMS-986325, вводимая внутривенно, обеспечит достаточный запас безопасности воздействия, которая в 1192982 раза ниже величины NOAEL оцененной на основании AUC, и в 26111 раз ниже для оценки по C_{max} (Фигура 5).

Выбор верхней дозы и диапазона доз

[00108] При введении путем внутривенной инфузии предлагаемая максимальная доза при SAD составляет 1000 мг. Эта доза должна быть проверена в случае, если у пациентов с иммуноопосредованным заболеванием наблюдается значительный TMDD, что может потребовать введения нагрузочной дозы в будущих исследованиях, как было показано в исследовании фазы 2а искалимаба у пациентов с первичным синдромом Шегрена. На основании оценок, полученных в 1-месячном токсикологическом исследовании на обезьянах предполагается, что доза 1000 мг BMS-986325, вводимая внутривенно, обеспечит достижение величины RO CD40 равной 99% (при C_{max}) и необходимый эффект действия, и при этом C_{max} и AUC будут соответственно в 6 и 14 раз, ниже, чем при NOAEL (100 мг/кг/неделя), (см. Фигуру 5).

[00109] На основе прогноза предполагается, что для поддержания минимального значения величины RO >95%, при условии того же фармакокинетического профиля у участников с синдромом Шегрена, что и у здоровых участников, эффективная доза для человека составит 90 мг при введении один раз в неделю, или 240 мг при введении один раз в 2 недели. Схема повышения дозы SAD и соответствующие прогнозируемые фармакокинетические показатели, значения RO и безопасные дозы для человека, основанные на подходах NOAEL и MABEL, представлены на Фигуре 4.

[00110] В целом, предлагаемые для этого исследования дозы будут охватывать ожидаемый диапазон эффективных доз, прогнозируемых для значимых PD-эффектов, и считается, что они будут находиться в пределах соответствующего запаса безопасности, определенного по результатам доклинических токсикологических исследований. Решения о повышении дозы для исследования SAD будут зависеть от оценки безопасности, переносимости (включая сообщения о нежелательных явлениях, данные физического осмотра, результаты клинических лабораторных исследований, показатели жизнедеятельности, ЭКГ и биомаркеры безопасности для PD), а также любых доступных данных по PK и RO для каждой дозы и групп участников.

[00111] Несмотря на то, что варианты осуществления настоящего изобретения были описаны в совокупности с вышеприведенными примерами, следует понимать, что могут быть выполнены различные модификации вариантов осуществления, не отступая от сущности таких их осуществления, и специалистам в данной области техники такие варианты понятны.

[00112] Эти и другие аспекты, раскрытые в настоящем документе, включая приведенные в качестве иллюстративных примеров конкретные способы лечения, лекарственные средства и способы применения, очевидны из идей, изложенных в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена, у пациента-человека, предусматривающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одной дозы выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, которые специфически связываются с CD40 человека, где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит первую полипептидную часть, содержащую переменную область тяжелой цепи, и вторую полипептидную часть, содержащую переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит (i) CDR1, содержащую SYWMH (SEQ ID NO: 1), CDR2, содержащую QINPTTGRSQYNEKFKT (SEQ ID NO: 2), и CDR3, содержащую WGLQPFAY (SEQ ID NO: 3); и

переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 7), CDR2, содержащую SASRYT (SEQ ID NO: 8), и CDR3, содержащую QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 9),

где доза составляет от 0,3 миллиграмма (мг) до 1000 мг антитела или его антигенсвязывающей части.

2. Способ по п. 1, в котором аутоиммунное заболевание представляет собой синдром Шегрена.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором выделенное антитело или его антигенсвязывающая часть содержат домен Fc IgG1 человека, содержащий мутацию в положении 238 по Kabat, которая снижает связывание с Fc-гамма-рецепторами (FcγR), где пролин 238 (P238) заменен на один из остатков, выбранных из группы, состоящей из лизина, серина, аланина, аргинина и триптофана.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором введение осуществляют подкожно, и доза составляет от 100 до 1000 мг антитела или его антигенсвязывающей части.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором введение осуществляют подкожно, и доза составляет 100 мг, 200 мг, 300 мг, 600 мг или 1000 мг антитела или его антигенсвязывающей части.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором введение осуществляют подкожно, доза составляет от 100 до 1000 мг антитела или его антигенсвязывающей части, и способ предусматривает по меньшей мере четыре повторения стадии введения.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором введение осуществляют подкожно, доза составляет от 100 до 600 мг антитела, вводимого еженедельно, и способ предусматривает по меньшей мере четыре повторения стадии введения.

8. Способ по любому из пп. 1-3, в котором введение осуществляют внутривенно, и доза составляет от 0,3 до 1000 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

9. Способ по п. 8, в котором введение осуществляют внутривенно, и доза выбрана из 100 мг, 150 мг, 300 мг или 600 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

10. Способ по п. 8 или 9, в котором введение осуществляют внутривенно, доза выбрана из 100 мг, 300 мг или 600 мг антитела, и способ предусматривает по меньшей мере четыре повторения стадии введения.

11. Способ по любому из пп. 8-10, в котором введение осуществляют внутривенно, доза выбрана из 100 мг, 300 мг или 600 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые вводят еженедельно, и способ предусматривает по меньшей мере четыре повторения стадии введения.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с иммуносупрессивным/иммуномодулирующим и/или противовоспалительным средством.

13. Способ по п. 12, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и иммуносупрессивное/иммуномодулирующее и/или противовоспалительное средство вводят последовательно.

14. Способ по п. 12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и иммуносупрессивное/иммуномодулирующее и/или противовоспалительное средство вводят одновременно.

15. Способ по п. 12, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и иммуносупрессивное/иммуномодулирующее и/или противовоспалительное средство представлены в составе одной композиции.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержат первую полипептидную часть, содержащую переменную область тяжелой цепи, и вторую полипептидную часть, содержащую переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV**SCKASGYAFT****SYWMHW****VRQAPGQGLEWMG****QINPTT**
GRSQYNEKFKTR**VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR****WGLOPFAY****WGQGT**
LVTVSS (SEQ ID NO: 4), и

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность
DIQMTQSPSFLSASVGDRV**TITC****KASQDVSTAW****WYQQKPGKAPKLLIY****SASYRYT****GV**
SRFSGSGSGTDFTLTIS**SLQPEDFATYYC****QQHYSTPWT****FGGGTKVEIK** (SEQ ID NO: 10).

17. Способ по любому из пп. 1-15, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержат домен Fc, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 13; IgG1-P238K (-C-концевой Lys)),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 14; IgG1-P238K),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 15; CH1-IgG1-P238K (-C-
концевой Lys)),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 16; CH1-IgG1-P238K),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G (SEQ ID NO: 17; IgG1f-P238K (-C-концевой Lys)),

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18; IgG1f-P238K),

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 19; CH1-IgG1f-P238K (-C-концевой Lys))

или

*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID No: 20; CH1-IgG1f-P238K).

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержат:

первую полипептидную часть, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFT**SYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**QINPTT**
GRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLOPFAY**WGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K - без концевого лизина); и

вторую полипептидную часть, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITC**KASQDVSTAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYSTPWT**FGGGTKVEIKRTVAAPS**VFI**FP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL).

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой антитело BMS-986325, в котором:

первая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQI
NPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1-P238K - без концевого лизина); и

вторая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITIT**KASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP**
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQHYSTPWT**FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL).

20. Набор для лечения аутоиммунного заболевания, такого как синдром Шегрена, у пациента-человека, где набор содержит:

(а) дозу антитела BMS-986325, в котором

первая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQI
NPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGLOPFAYWG**
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 5; HC_Y12XX-hz28-
 CH1-IgG1-P238K- без концевого лизина); и

вторая полипептидная часть имеет аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSFLSASVGDRVITIT**KASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR**
YTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST

LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11; LC_Y12XX-hz28-CL), и

(b) инструктивный материал по применению антитела в способе по любому из пп. 1-19.

21. Набор по п. 20, в котором доза антитела BMS-986325 находится в диапазоне от 0,3 миллиграмма (мг) до 1000 мг.

22. Набор по п. 20 или 21, в котором доза антитела BMS-986325 представлена в композиции, содержащей 20 мМ гистидина, 250 мМ сахарозы, 50 мкмоль пентетиновой кислоты и 0,05% (масс./об.) полисорбата 80, pH 6,0.

ФИГУРА 1

Последовательность аминокислот тяжелой цепи BMS-986325:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYN
EKFKTRVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 5)

Последовательность аминокислот легкой цепи BMS-986325:

DIQMTQSPSFSLASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 11)

ФИГУРА 2А

Первичная фармакодинамика		
Тип исследования	Тестовая система	Результаты
Сродство связывания CD40	Измерение связывания BMS-986325 с внеклеточным доменом CD40 человека, яванского макака, крысы и мыши с помощью SPR	BMS-986325 связывался с CD40 человека с Kd 5,3 нМ, и с CD40 яванского макака с Kd 6,7 нМ. Связывания с мышинным и крысиным CD40 не обнаружено.
Привязка к FcγRs	Измерение связывания BMS-986325 с внеклеточным доменом CD32, CD16 и CD64 с помощью SPR	Связывание BMS-986325 с CD16 и CD32 не обнаружено. Связывание BMS-986325 снижено в 100 раз по сравнению с белками, содержащими IgG1 дикого типа (Kd 17 нМ).
Ингибирование пролиферации В-клеток	Стимуляция растворимым тримером CD40L тонзиллярных В-клеток человека	BMS-986325 ингибирует пролиферацию В-клеток с IC ₅₀ 0,04 ± 0,03 нМ (5,6 ± 3,9 нг /мл; n=10 доноров).
	Стимуляция CD40L-экспрессирующими клетками CHO пролиферации тонзиллярных В-клеток	BMS-986325 ингибирует пролиферацию В-клеток с IC ₅₀ 0,28 ± 0,07 нМ (39,9 ± 9,8 нг /мл; n=8 доноров).
Активация В-клеток цельной крови человека	Стимуляция растворимым тримером CD40L В-клеток человека в цельной крови	BMS-986325 ингибирует активацию CD86 с IC ₅₀ 0,24 ± 0,06 нМ (34,2 ± 9,1 нг /мл; n=10 доноров). BMS-986325 ингибирует активацию CD54 с IC ₅₀ 0,24 ± 0,06 нМ. (34,6 ± 8,7 нг /мл; n=10 доноров).
Активация В-клеток яванского макака цельной крови	Стимуляция растворимым тримером CD40L В-клеток яванского макака в цельной крови	BMS-986325 ингибирует активацию CD86 с IC ₅₀ 0,25 ± 0,09 нМ. (36,4 ± 12,4 нг /мл; n=8 доноров).
Ингибирование пролиферации В-клеток яванского макака	Стимуляция растворимым тримером CD40L или CD40L-экспрессирующими клетками CHO В-клеток селезенки яванского макака	BMS-986325 ингибирует пролиферацию В-клеток селезенки, управляемую CD40L-тримером, с IC ₅₀ 0,19 ± 0,18 нМ (27,8 ± 25,9 нг/мл; n = 6 доноров), а также пролиферацию, управляемую CD40L-экспрессирующими клетками CHO, с IC ₅₀ 4,5 ± 5,4 нМ (650,5 ± 782,7 нг/мл; n=6 доноров).

ФИГУРА 2В

Первичная фармакодинамика		
Тип исследования	Тестовая система	Результаты
Ингибирование активации DC	DC, происходящие из моноцитов	BMS-986325 подавляет индуцированную CHO CD40L продукцию IL-6 с IC50 $0,08 \pm 0,04$ нМ ($11,3 \pm 5,3$ мкг/мл) и продукцию TNF α с IC50 $0,1 \pm 0,03$ нМ ($13,3 \pm 4,8$ мкг/мл); n=4 донора.
Связывание BMS-986325 с В-клетками	Прямое связывание меченого AF488 BMS-986325 с В-клетками в цельной крови человека	Меченый AF488-BMS-986325 связывается с CD20-положительными В-клетками в цельной крови человека с активностью (EC50) $0,90 \pm 0,45$ нМ ($130,4 \pm 65,9$ нг/мл; n=4 донора).
	Прямое связывание BMS-986325, меченого AF488, с В-клетками в цельной крови яванского макака	AF488-меченый BMS-986325, связывается с CD20-положительными В-клетками в цельной крови яванского макака с активностью (EC50) $1,0$ нМ ($149,5$ нг/мл; n=2 донора).
	Связывание BMS-986325 с В-клетками в цельной крови яванского макака с использованием для обнаружения вторичного антитела к IgG1-PE человека	BMS-986325 связывается с CD20-положительными В-клетками в цельной крови яванского макака с активностью (EC50) $0,7 \pm 0,15$ нМ ($106,1 \pm 22,6$ нг/мл; n=4 донора).
Анализ на наличие агонизма (пролиферация В-клеток или продукция цитокинов)	Способность BMS-986325 стимулировать пролиферацию тонзиллярных В-клеток человека или продукцию IL-6 +/- IL-4	BMS-986325 (в концентрациях до 10 мкг/мл) не увеличивает пролиферацию В-клеток или продукцию IL-6 ни отдельно и ни в комбинации с IL-4 тонзиллярными В-клетками от 10 доноров.
Анализ на наличие агонизма (активация iDC или продукция цитокинов)	Инкубирование незрелых DC с BMS-986325 либо отдельно, либо с добавлением Fc γ R-экспрессирующих клеток (CHO-CD32)	BMS-986325, как отдельно, так и в присутствии экспрессирующих CD32 клеток CHO, не повышает маркеры активации (экспрессия CD86 или CD54 на клеточной поверхности) или продукцию IL-6 в незрелых DC. Эксперименты проводили с клетками от 10 разных доноров и концентрациями BMS-986325 до 100 мкг/мл.
Активация В-клеток человека в цельной крови	Анализ в отношении способности BMS-0986325 увеличивать экспрессию CD54, CD69 или CD86 на В-клетках в цельной крови человека	BMS-986325 не вызывал значимого увеличения экспрессии CD54, CD69 или CD86 на В-клетках в цельной крови от 6 доноров при концентрациях до 12 мкг/мл.

ФИГУРА 2С

Первичная фармакодинамика		
Тип исследования	Тестовая система	Результаты
Активация CD40-NFκB, репортерный анализ	Чувствительный репортерный анализ CD40-NFκB в клеточной линии RAMOS B +/- с коэкспрессией FcγR (CD32)	BMS-986325 не активировал репортер CD40- NFκB в концентрациях до 10 мкг /мл (n=3 независимых эксперимента) как с коэкспрессией CD32, так и без нее.
Отсутствие эффекторной функции с BMS-986325	ADDC, CDC и ADCP	BMS-986325 не индуцировал ADCC-, CDC- или ADCP-опосредованного уничтожения клеток-мишеней, экспрессирующих CD40. BMS 986325 не индуцировал опосредованный ADCC лизис клеток Raji эффекторными клетками НК на клетках, экспрессирующих CD40, в то время как ритуксимаб в положительном контроле индуцировал его. BMS-986325 не индуцировал CDC, в то время как ритуксимаб в положительном контроле индуцировал его. BMS-986325 не индуцировал фагоцитоз CD40-экспрессирующих клеток Raji .

ФИГУРА 3

Тип исследования/ вид/ штамм	Схема/ Путь введения/ Продолжительность исследования/ Носитель/ Препарат	Диапазон доз (мг/кг)	Животные на группу (F/M)	Значимые результаты
Первичная фармакодинамика				
RO, взаимодействие с мишенью и PD-ответы in vivo	RO и ингибирование растворимого тримера CD40L, стимуляция активации В-клеток и Т-клеточно-зависимых гуморальных ответов на иммунизацию KLH	1, 10 и 100 мг/кг, SC	2 самца и 2 самки	У животных, получавших дозу, наблюдалась дозозависимая продолжительность В-клеточных RO и PD-ответов. Полный RO наблюдался при всех дозах до 8-го дня, при этом RO падал до исходного уровня к 18-му дню для дозы 1 мг/кг и к 43-му дню для дозы 10 мг/кг. Полный RO поддерживался в течение всех 43 дней исследования при дозе 100 мг/кг. В среднем полное ингибирование PD-ответа (CD40L-индуцированная активация В-клеток) наблюдалось в течение 8-и дней при всех дозах. Прекращение PD-ответа зависело от дозы, и оно наблюдалось на 15-й день при дозе 1 мг/кг, на 43-й день при дозе 10 мг/кг и PD-ответ сохранялся до 43-го дня при дозе 100 мг/кг. Кроме того, наблюдали подавление гуморального ответа на иммунизацию KLH, когда RO поддерживали на уровне ~>90% до 29-го дня при дозах >10 мг/кг.

ФИГУРА 4

Прогнозируемые пределы безопасности и эффективности BMS-986325 для внутривенных доз SAD (Части A1-A9)						
Группы/исследование	Доза ^a (мг)	Прогнозируемое воздействие		Подход NOAEL подход ^b		Подход MABEL
		C _{max} ^a (мкг/мл)	AUC(INF) ^a (мкг/мл·ч)	C _{max} (допустимый запас)	AUC (допустимый запас)	Макс. CD40 RO ^{a,c} (%)
A1	0,3	0,09	0,57	26111	1192982	39,5
A2	1	0,3	2,4	7833	283333	35,9
A3	3	1	12	2350	56667	64,7
A4	10	4	79	588	8608	86,6
A5	30	11	436	214	1560	95,2
A6	100	37	2495	64	273	98,5
A7	300	111	11219	21	61	99,5
A8	600	223	27061	11	25	99,8
A9	1000	371	49871	6	14	99,8

a: При продолжительности инфузии 60 минут.

b: NOAEL составляет 100 мг/кг при внутривенном введении, по результатам 1-месячного токсикологического исследования GLP на обезьянах (C_{max} = 2350 мкг/мл и AUC = 680000 мкг/мл·ч).

c: Основано на максимальной дозе для человека массой 70 кг.

ФИГУРА 5

Прогнозируемый запас безопасности для BMS-986325								
Виды/Исследование	Доза NOAEL мг/кг	Cmax мкг /мл	AUC (0-168 ч) мкг·ч /мл	Общая AUC (4 недели) ^a мкг·ч /мл	Доклинические границы при дозах FIH SAD ^b			
					Параметр	IV		SC
						0,3 мг	1000 мг	300 мг
Обезьяна: яванский макак/ месяц (неделя)	100	2350	170000	680000	Доза (мг/кг):	23333	7	23
					AUC:	1192982	14	80
					Cmax:	26111	6	55
Клинические испытания фазы 1 Прогноз дозы для человека		Доза мг	Прогнозируемая Cmax мкг/мл		Прогнозируемая AUC(INF) мкг·ч /мл			
SAD начальная доза САД		0,3	0,09		0,57			
SAD максимальная IV доза		1000	371		49871			
SAD SC доза		300	43		8567			
а: AUC(0-168 ч) после последней недельной дозы у обезьян умножали на 4 для нормализации диапазона общего дозирования в течение 4-х недель (общая AUC[4 недели]) в 1-месячном исследовании токсичности.								
b: Основано на максимальной дозе для человека массой 70 кг.								