

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090449** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.07.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/10* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.02

(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ PD-L1 И CD137, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) PCT/EP2017/069839;
PCT/EP2018/052946

(32) 2017.08.04; 2018.02.06

(33) EP

(86) PCT/EP2018/071002

(87) WO 2019/025545 2019.02.07

(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK); БИОНТЕХ СЕ
(DE)

(72) Изобретатель:
Алтинтас Изил, Сатейн Давид,
Радемакер Рик, Паррен Паул (NL),
Сахин Угур, Гисеке Фридерике, Муйк
Александр, Грунвиц Кристиан (DE)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым связывающим агентам и их применению в медицине. В особенности, изобретение относится к связывающим агентам, таким как биспецифические антитела, связывающие человеческий PD-L1 и связывающие человеческий CD137. Изобретение, кроме того, относится к применению антител изобретения и к способам, конструкциям нуклеиновых кислот и клеткам-хозяевам для продуцирования антител изобретения.

202090449
A1

202090449

A1

СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ PD-L1 И CD137 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым связывающим агентам и их применению в медицине. В особенности, изобретение относится к связывающим агентам, таким как биспецифические антитела, связывающие человеческий PD-L1 и связывающие человеческий CD137. Изобретение, кроме того, относится к применению связывающих агентов по изобретению и к способам, конструкциям нуклеиновых кислот и клеткам-хозяевам для продуцирования антител по изобретению.

Уровень техники

CD137 (4-1BB, TNFRSF9) является членом семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). CD137 представляет собой костимулирующую молекулу на CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетках, регуляторных Т-клетках (Tregs), естественных киллерах (NK) и NKT-клетках, В-клетках и нейтрофилах. На Т-клетках CD137 не экспрессируется постоянно, но индуцируется при активации Т-клеточного рецептора (TCR). Стимуляция с помощью его природного лиганда 4-1BBL или антител-агонистов приводит к передаче сигналов через TNFR-ассоциированный фактор (TRAF)-2 и TRAF-1, применяемый в качестве адаптеров. Ранняя передача сигналов CD137 включает реакции полиубиквитинирования K-63, которые в конечном итоге приводят к активации путей ядерного фактора (NF)-κB и митоген-активируемой протеин-(MAP)-киназы. Передача сигналов ведет к усилению костимуляции Т-клеток, пролиферации, продукции цитокинов, созреванию и длительному выживанию Т-клеток CD8⁺. В различных доклинических моделях было показано, что агонистические антитела против CD137 способствуют противоопухолевому контролю Т-клеток (Murillo et al. 2008 Clin. Cancer Res. 14 (21): 6895-6906). Антитела, стимулирующие CD137, могут индуцировать выживание и пролиферацию Т-клеток, тем самым усиливая противоопухолевый иммунный ответ. Антитела, стимулирующие CD137, были раскрыты в предшествующем уровне техники и включают урелумаб, человеческое антитело IgG4 (WO2005035584) и утомилумаб, человеческое антитело IgG2 (Fisher et al. 2012 Cancer Immunol. Immunother. 61: 1721-1733).

Лиганд белка программируемой смерти 1 (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1) представляет собой один раз пронизывающий мембрану белок типа I с молекулярной массой, равной 33-кДа. На основе альтернативного сплайсинга были описаны три изоформы PD-L1. PD-L1 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и

включает один Ig-подобный домен C2-типа и один Ig-подобный домен V-типа. Свежевыделенные Т- и В-клетки экспрессируют незначительное количество PD-L1, а фракция (около 16%) моноцитов CD14⁺ конститутивно экспрессирует PD-L1. Однако известно, что интерферон- γ (IFN γ) активирует PD-L1 в опухолевых клетках.

PD-L1 препятствует противоопухолевому иммунитету путем 1) придания толерантности опухолево-реактивным Т-клеткам путем связывания с их рецептором, белком программируемой смерти клеток 1 (PD-1) (CD279) на активированных Т-клетках; 2) придания опухолевым клеткам устойчивости к Т-клеткам CD8⁺ и Fas-опосредованному лизису посредством передачи сигналов PD-1 через экспрессируемый опухолевыми клетками PD-L1; 3) придания толерантности Т-клеткам путем обратной передачи сигналов через экспрессируемый Т-клетками CD80 (B7.1); и 4) содействия развитию и поддержанию индуцированных регуляторных Т-клеток. PD-L1 экспрессируется при многих раковых заболеваниях человека, включая меланому, рак яичников, рак легких и рак толстой кишки (Latchman et al., 2004 Proc Natl Acad Sci USA 101, 10691-6).

Антитела, блокирующие PD-L1, продемонстрировали клиническую активность при некоторых раковых заболеваниях, о которых известно, что они сверхэкспрессируют PD-L1 (включая меланому, NSCLC). Например, атезолизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 против PD-L1. В настоящее время он проходит клинические испытания в качестве иммунотерапии по нескольким показаниям, включая различные типы солидных опухолей (смотри, например, Rittmeyer et al., 2017 Lancet 389: 255-265) и одобрен для немелкоклеточного рака легкого и рака мочевого пузыря. Авелумаб, антитело к PD-L1, (Kaufman et al. Lancet Oncol. 2016; 17 (10): 1374-1385), было одобрено FDA для лечения взрослых и детей в возрасте 12 лет и старше с метастатической карциномой Меркеля, и в настоящее время он проходит клинические испытания по нескольким показаниям рака, включая рак мочевого пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, мезотелиому, NSCLC, рак яичников и рак почек. Дурвалумаб, антитело к PD-L1, одобрено для лечения местно-распространенного или метастатического уротелиального рака и находится в клинической разработке при множественных солидных опухолях и раках крови (смотри, например, Massard et al., 2016 J Clin Oncol. 34 (26): 3119 -25). Другие антитела против PD-L1 были описаны в WO2004004771, WO2007005874, WO2010036959, WO2010077634, WO2013079174, WO2013164694, WO2013173223 и WO2014022758.

Horton et al. (J. Immunother Cancer. 2015; 3 (Suppl 2): O10) раскрывает комбинацию агонистического антитела 4-1BB с нейтрализующим антителом PD-L1.

Комбинированная терапия утомилумабом и авелумабом в настоящее время

проходит апробацию в клинике (Chen et al., J Clin Oncol 35, 2017, Suppl; abstr TPS7575 и клиническое исследование NCT02554812).

Однако, несмотря на достижения в данной области, существует потребность в мультиспецифических антителах, которые могут связывать как PD-L1, так и CD137. Это дает одновременное связывание с PD-L1-экспрессирующими антиген-презентирующими клетками (APC) или с опухолевыми клетками и CD137-экспрессирующими Т-клетками, что приводит к условной активации (цитотоксических) Т-клеток. Связывание PD-L1 с PD1, экспрессируемым на активированных Т-клетках, приведет к ингибированию Т-клеток. Соответственно, цель настоящего изобретения – это обеспечение биспецифических связывающих агентов PD-L1xCD137, таких как биспецифические антитела, которые блокируют передачу сигналов, ингибирующих PD1-(PD-L1), и в то же время костимулируют Т-клетки посредством транс-связывания с молекулой CD137, экспрессируемой на активированных Т-клетках, причем активация происходит через транс-связывание. Это может привести к эффективной индукции противоопухолевого иммунитета. Еще одна цель настоящего изобретения – это обеспечение биспецифического связывающего агента PD-L1xCD137 с инертной областью Fc или, альтернативно, без области связывания Fc, обеспечивая тем самым биспецифический связывающий агент, который не индуцирует комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) или другие Fc-опосредованные эффекторные функции на Т-клетках при связывании с CD137. Еще одна цель настоящего изобретения – это обеспечение биспецифического связывающего агента PD-L1xCD137, подходящего для активации Т-клеток. Еще одна цель настоящего изобретения – это обеспечение биспецифического связывающего агента PD-L1xCD137, подходящего для активации опухолеспецифических Т-клеток, таких как инфильтрирующие опухоль Т-клетки. Еще одна цель настоящего изобретения – это обеспечение биспецифического связывающего агента с улучшенным токсикологическим профилем по сравнению с современными вариантами лечения в данной области техники. Еще одна цель настоящего изобретения – это создание связывающего агента с улучшенным профилем эффективности по сравнению с существующими вариантами лечения в данной области.

Раскрытие изобретения

В первом аспекте изобретение относится к связывающим агентам, включающим первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, где вторая антигенсвязывающая область ингибирует связывание человеческого PD-L1 для человеческого PD-1. Такие связывающие агенты, включающие первую и вторую

антигенсвязывающую область, обладают двойным эффектом:

Во-первых, через свою связывающую область PD-L1 связывающий агент связывает экспрессирующие PD-L1 опухолевые клетки или антиген-презентирующие клетки (АРС), в то время как через свою связывающую CD137 связывающий агент связывает и активирует Т-клетки, что приводит к условной активации Т-клеток. Таким образом, не будучи связанными теорией, связывающий агент согласно изобретению может опосредовать кластеризацию CD137, если связывающий агент одновременно связывается с PD-L1 и CD137. Кластеризация CD137 с помощью связывающего агента необходима для достаточной активации этого рецептора и CD137-опосредованной костимуляции Т-клеток. Во-вторых, связывающий агент, таким образом, доставляет Т-клетки в непосредственную близость от опухолевых клеток, тем самым способствуя уничтожению опухолевых клеток Т-клетками. Кроме того, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, предполагается, что введение опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, и эффекторных Т-клеток, таких как Т-клетки CD8⁺, в непосредственную близость друг к другу, может инициировать высвобождение интерферона- γ , который, в свою очередь, может активировать PD-L1 на опухолевых клетках, тем самым способствуя привлечению большего количества связывающего агента к опухоли и дополнительно усиливая ее уничтожение.

Наконец, связывающий агент по изобретению ингибирует связывание человеческого PD-L1 с человеческим PD-1, таким образом предотвращая участие PD-L1 в блокировании противоопухолевого иммунитета через PD-1. Таким образом, связывающий агент предотвращает получение ингибирующего сигнала Т-клетками посредством взаимодействия PD-1/PD-L1, в то же время они получают сигнал активации через связывание с молекулой CD137, что приводит к передаче сигналов, которые усиливают функции пролиферации, активации, эффектора и памяти Т-клеток.

Связывающие агенты PD-L1xCD137 по настоящему изобретению особенно полезны в терапевтических планах, в которых стимуляция рецептора активации, такого как CD137, и блокирование сигнала ингибирования, такого как PD-1/PD-L1, на Т-клетках могут быть достигнуты одновременно. Это может привести к более высокой величине пролиферации, активации и выживаемости Т-клеток, чем стимуляция CD137 и блокирование PD-1/PD-L1 через PD-L1 по отдельности.

В одном воплощении изобретения связывающий агент PD-L1xCD137 представляет собой биспецифическое антитело.

В другом воплощении изобретения, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело, имеющее первую антигенсвязывающую область,

связывающуюся с CD137 человека, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с PD-L1 человека, где вторая антигенсвязывающая область ингибирует связывание человеческого PD-L1 с PD-1 человека.

В дополнительном воплощении изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, где а) первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 9, 10, 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO 13, GAS, 14, соответственно, и б) вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23 соответственно.

Альтернативно, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, где а) первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 50, 51, 52, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS, 55 соответственно, и б) вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в: SEQ ID NO: 18, 19, 20 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

В другом воплощении изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, которая была получена из гуманизованного антитела, и/или вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, которая была получена из человеческого антитела.

В дополнительном аспекте изобретение относится к применению связывающих агентов по изобретению в медицине, в особенности, для лечения рака.

Эти и другие аспекты и воплощения изобретения, включая нуклеиновые кислоты,

кодирующие аминокислотные последовательности таких связывающих агентов, например, антитела; векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты; клетки, содержащие такие нуклеиновые кислоты или векторы экспрессии; композиции, содержащие такие связывающие агенты, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии или клетки; такие связывающие агенты, нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии, клетки или композиции для применения при лечении рака или других заболеваний; способы получения таких связывающих агентов, например, биспецифические антитела; и диагностические способы и наборы на основе таких связывающих агентов, например, мультиспецифические, в частности, биспецифические антитела, будут более подробно описаны ниже.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Выравнивание последовательностей CD137 для человека, африканского слона и дикого кабана. Аминокислоты CD137 африканского слона и дикого кабана, которые отличаются от таковых в человеческой последовательности, выделены черным.

Фигура 2: Конструкции CD137 с перестановками, содержащие домены CD137 африканского слона (перестановка 5) или дикого кабана (перестановка 1-4, 6).

Фигура 3: Экспрессия конструкций CD137 с перестановками на клетках НЕК293-T17.

Клетки НЕК293-T17 трансфицировали конструкциями CD137 с перестановками. Экспрессию на клеточной поверхности конструкций измеряли с помощью проточной цитометрии с применением поликлонального антитела против CD137, которое распознает CD137 человека, дикого кабана и африканского слона.

Фигура 4: Связывание антитела CD137-009 с конструкциями CD137 с перестановками, экспрессируемыми на клетках НЕК293-T17. Клетки НЕК293-T17 трансфицировали конструкциями CD137 с перестановки и человеческим CD137 (hCD137 вес), CD137 африканского слона или дикого кабана. Связывание антитела CD137-009 с этими конструкциями, экспрессируемыми на клетках НЕК293-T17, измеряли с помощью проточной цитометрии. Окрашивание поликлональными анти-CD137 антителами приведено в качестве контроля.

Фигура 5: Влияние моновалентного антитела b12-FEALxPD-L1-547-FEAR на взаимодействие PD-1/PD-L1. Эффект b12-FEALxPD-L1-547-FEAR был определен в биоанализе ингибирования PD-1/PD-L1. Приведенные данные представляют собой кратность индукцию относительно контроля (без добавления антител) для одного репрезентативного эксперимента.

Фигура 6: Схематическое изображение ожидаемого способа действия

биспецифических антител CD137хPD-L1. (А) PD-L1 экспрессируется на антиген-презентирующих клетках (АРС), а также на опухолевых клетках. Связывание PD-L1 с Т-клетками, экспрессирующими отрицательную регуляторную молекулу PD-1, эффективно перекрывает сигналы активации Т-клеток и, в конечном итоге, приводит к ингибированию Т-клеток. (В) После добавления биспецифического антитела CD137хPD-L1, ингибирующее взаимодействие PD-1: PD-L1 блокируется через фрагмент, специфичный для PD-L1, и в то же время, биспецифическое антитело посредством межклеточного взаимодействия обеспечивает агонистическую передачу сигнала к CD137, экспрессируемому на Т-клетках, что приводит к сильной костимуляции Т-клеток.

Фигура 7: Снятие опосредованного PD-1/PD-L1 ингибирования Т-клеток и дополнительная костимуляция пролиферации Т-клеток CD8⁺ с помощью CD137-009-FEALхPD-L1-547-FEAR в антиген-специфическом анализе Т-клеток с активной осью PD-1/PD-L1. Меченные CFSE Т-клетки, электропорированные с клаудин-6-специфичным TCR- и PD-1-транслированной (IVT)-РНК, инкубировали с клаудин-6-IVT-РНК-электропорированными незрелыми дендритными клетками в присутствии 0,1 мкг/мл и 0,02 мкг/мл CD137-009-FEALхPD-L1-547-FEAR, b12-FEALхPD-L1-547-FEAR или с контрольным антителом b12 в течение пяти дней. Пролиферацию CD8⁺ Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Приведенные данные представляют собой (А и С) репрезентативную гистограмму CFSE от двух разных доноров и (В и D) соответствующие процентные доли разделившихся клеток и индекс пролиферации, рассчитанные с применением программного обеспечения FlowJo. (В) показывает анализ данных от донора 1, представленного в (А). (D) показывает анализ данных от донора 2, репрезентативно показанного на (С). Столбики ошибок (SD) указывают на вариации в эксперименте (три повтора с применением клеток от одного донора).

Фигура 8: Анализ значения EC₅₀ биспецифического антитела CD137-009-FEALхPD-L1-547-FEAR в анализе антиген-специфических Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1. Меченные с помощью CFSE Т-клетки, электропорированные с клаудин-6-специфической TCR- и PD-1-IVT-РНК, инкубировали с электропорированными клаудин-6-IVT-РНК незрелыми дендритными клетками в присутствии CD137-009-FEALхPD-L1-547-FEAR (при 3-кратном серийном разведении от 1 до 0,00015 мкг/мл) в течение пяти дней. Пролиферацию CD8⁺ Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Приведенные данные представляют собой процентное содержание разделившихся клеток (открытые ромбы) и индексы пролиферации (заполненные треугольники) в зависимости от концентрации антитела. Столбики ошибок (SD) указывают на отклонения в эксперименте (шесть повторов с применением клеток от одного донора). Кривые

подбирали с помощью нелинейной регрессии, а значения EC_{50} определяли с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

Фигура 9: Сравнение CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR с комбинацией двух моновалентно связывающихся антител CD137 (CD137-009-FEALxb12-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) или двух родительских антител (CD137-009 + PD-L1-547) в антиген-специфическом анализе Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1. Меченные с помощью CFSE Т-клетки, электропорированные с клаудин-6-специфичной TCR- и PD1-IVT-РНК, инкубировали с электропорированными с клаудин-6-IVT-РНК незрелыми дендритными клетками в присутствии 0,25 мкг/мл (i) CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR, (ii) CD137-009-FEALxb12 + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, (iii) CD137-009-FEALxb12, (iv) b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, (v) CD137-009 + PD-L1-547, (vi) CD137-009, (vii) PD-L1-547 или (viii) контрольного антитела b12 в течение пяти дней. Пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой (А) репрезентативные гистограммы CFSE и (В и С) соответствующие средние значения процента деленных клеток и индекса пролиферации, рассчитанные с применением программного обеспечения FlowJo. Столбики ошибок (SD) указывают на отклонения в эксперименте (три повтора с применением клеток от одного донора).

Фигура 10: *Ex vivo* экспансия опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) в результате резекции ткани немелкоклеточного рака легкого человека с помощью CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR. Кусочки опухоли из резецированной ткани культивировали с 10 ед/мл IL-2 и указанной концентрацией CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR. После 10 дней культивирования клетки собирали и анализировали проточной цитометрией. (А) TIL подсчитывали как кратность экспансии по сравнению с необработанными контролями, (В) $CD3^+CD8^+$ Т-клетки подсчитывали как кратность экспансии по сравнению с необработанными контролями, (С) $CD3^+CD4^+$ Т-клетки подсчитывали как кратность экспансии по сравнению с необработанными контролями, (D) $CD3-CD56^+$ NK-клеток как подсчитывали как кратность экспансии по сравнению с необработанными контролями. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для $n = 5$ отдельных лунок с двумя кусочками опухоли на лунку в качестве исходного материала.

Фигура 11: Влияние суррогатного антитела мыши mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A на антигенспецифическую пролиферацию Т-клеток в установке для переноса адоптивных клеток OT-1. Специфичные для овальбумина (OVA) двойные положительные цитотоксические Т-клетки $OT1^+Thy1.1^+$, выделенные от донорских мышей ретро-орбитально (г.о.) инъецировали наивным C57BL/6 реципиентным мышам. На следующий день после переноса адоптивных клеток мышам-реципиентам вводили г.о. инъекцию с 100

мкг OVA в качестве антигенного стимула с последующей г.о. инъекцией 100 мкг или 20 мкг антитела mCD137-3H3xмPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 или mPD-L1-MPDL3280Axb12 на мышь. Инъекцию PBS (обозначенную как только OVA на фигуре) применяли в качестве исходного эталона, а необработанных животных применяли в качестве отрицательного контроля. Через 6 дней г.о. путем брали 100 мкл крови и анализировали на наличие Thy1.1⁺CD8⁺ Т-клеток. Приведенные данные представляют собой (А) схематическое изображение экспериментальной схемы переноса адоптивных клеток OT-I и (В) частоту Thy1.1⁺CD8⁺ Т-клеток для каждой группы лечения в день 6. Квадраты представляют собой отдельных животных, а столбцы ошибок (SD) указывают на различия в эксперименте (n = 5 мышей на группу). Статистический анализ был выполнен с применением однофакторного дисперсионного анализа с применением критериев множественного сравнения Тьюки; ns = нет существенной разницы между группами, *** = P < 0,001.

Фигура 12: Противоопухолевая эффективность суррогатного антитела мыши mCD137-3H3xмPD-L1-MPDL3280A на модели подкожной сингенной опухоли мыши CT26. Самок мышей BALB/c с подкожными опухолями CT26 лечили внутрибрюшинными инъекциями по 20 мкг антитела на мышь: (i) mCD137-3H3xмPD-L1-MPDL3280A, (ii) mCD137-3H3xb12 или (iii) mPD-L1-MPDL3280Axb12 или (iv) PBS, после того как опухоли достигли объема ≥ 30 мм³. График дозирования был следующим: каждые 2-3 дня для первых восьми инъекций, с последующими инъекциями каждые 7 дней до конца эксперимента. На 29-й день забирали 100 мкл крови г.о. путем и анализировали на наличие gr70-специфичных CD8⁺ Т-клеток. Показанные данные представляют собой (А) кривые роста опухоли с каждой линией, представляющей одну мышь, (В) полученный анализ выживаемости Каплана-Мейера и (С) специфичные для gr70 частоты CD8⁺ Т-клеток для каждой группы лечения на 29 день после имплантации, PFS = выживаемость без прогрессирования.

Фигура 13: Связывание моноспецифических, двухвалентных антител PD-L1 и моновалентных антител b12xPD-L1 с опухолевыми клетками. Связывание PD-L1-547 и b12-FEALxPD-L1-547-FEAR с клетками MDA-MB-231 (А), PC-3 (В) и SK-MES-1 (С). Приведенные данные представляют собой среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), определенную с помощью проточной цитометрии. Моноспецифические, двухвалентные антитела b12 были включены в качестве отрицательного контроля.

Фигура 14: Связывание антител CD137 с вариантами CD137 с мутациями аланина в положениях с 1 по 163. Связывание выражали в виде z-оценки (кратность изменения) в качестве меры изменения связывания по сравнению с контрольным антителом. Z-оценку

(кратность изменения) определяли как $(\text{нормализованное } gMFI_{\text{положение aa}} - \mu) / \sigma$, где μ и σ – среднее значение и стандартное отклонение нормализованного $gMFI$ по всем мутантам. Остатки, у которых z-оценка при связывании был ниже $-1,5$ (указано пунктирной линией), считали «потерей связывающих мутантов». Остатки с положительным z-оценками связывания представляют собой потерю связывающих остатков для специфического контрольного антитела, не блокирующего CD137. Число на оси x относится к положениям аминокислот. (A) Z-оценки для связывания вариантов b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488 с вариантами CD137 с мутациями аланина или глицина в положении от 1 до 163 с применением CD137-005-FEAR-A488 в качестве не перекрестно блокирующего специфического контрольного антитела CD137 для нормализации. (B) Z-оценки для связывания CD137-005-FEAR-A488 с вариантами CD137 с мутациями аланина или глицина в положении от 1 до 163, с применением CD137-MOR7480-FEAR-A488 в качестве не перекрестного блокирования специфического контрольного антитела CD137 для нормализации. (C) Z-оценки для связывания CD137-MOR7480-FEAR-A488 с вариантами CD137 с мутациями аланина или глицина в положении от 1 до 163 с применением CD137-005-FEAR-A488 в качестве не перекрестного блокирования специфического контрольного антитела CD137 для нормализации.

Фигура 15: Сравнение PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR с комбинацией двух одновалентных контролей (b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) или двух родительских антител (CD137-009-NC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR) в неантигенспецифическом анализе пролиферации Т-клеток. PBMC, меченные CFSE, инкубировали с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 (0,03 мкг/мл и 0,1 мкг/мл) или без (w/o) антитела против CD3 (в качестве отрицательного контроля для активации Т-клеток) и культивировали в присутствии 0,2 мкг/мл: i) PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, ii) b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR каждый, iii) b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, iv) b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, v) CD137-009-NC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR каждого, vi) CD137-009-NC7LC2-FEAR, vii) PD-L1-547-FEAR или viii) контрольного антитела b12-IgG-FEAL в течение четырех дней. Пролиферацию CD4⁺ (A) и CD8⁺ (B) Т-клеток измеряли проточной цитометрией. Данные представлены от трех доноров в виде среднего индекса экспансии в трех повторах, рассчитанного с применением программного обеспечения FlowJo v10.4. Столбики ошибок (SD) указывают на отклонения в эксперименте (три повтора с применением клеток от одного донора).

Фигура 16: Определение значений EC₅₀ для индукции пролиферации Т-клеток с помощью PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEARx в неантигенспецифическом

анализе пролиферации Т-клеток. PBMC, меченные CFSE, инкубировали в течение четырех дней с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 и серийными разведениями PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR (1 – 0,00015 мкг/мл) или 1 мкг/мл b12 IgG в качестве контрольного антитела. Показаны данные от двух репрезентативных доноров; PBMC от донора 1 стимулировали 0,03 мкг/мл анти-CD3 (А, В) и PBMC от донора 2 0,09 мкг/мл анти-CD3 (С, D). Пролиферацию CD4⁺ (А и С) и CD8⁺ (В и D) Т-клеток измеряли проточной цитометрией. Приведенные данные представляют собой средние значения индекса экспансии из трех повторов, рассчитанного с применением программного обеспечения FlowJo v10.4 и снабженные четырехпараметрическим логарифмическим соответствием. Столбики ошибок (SD) указывают на отклонения в эксперименте (три повтора с применением клеток от одного донора).

Фигура 17: Влияние PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR на секрецию 10 провоспалительных цитокинов в антигенспецифическом анализе Т-клеток с электропорацией PD-1 в Т-клетки или без нее. Т-клетки, электропорированные с CLDN6-специфической TCR- и с 2 мкг PD1-IVT-РНК или без нее, инкубировали с CLDN6-IVT-РНК-электропорацией iDC в присутствии различных концентраций CD137-009-NC7LC2-FEALxPD-L1-547 -FEAR (трехкратные серийные разведения; в диапазоне от 1 мкг/мл до 0,00015 мкг/мл) или контрольного антитела b12 b12-IgG-FEAL. Уровни цитокинов в супернатантах определяли через 48 часов после добавления антител с помощью мультиплексного сэндвич-иммуноанализа с применением набора MSD V-Plex Human Proinflammatory panel 1 (10-Plex). Каждая точка данных представляет среднее значение ± стандартное отклонение для трех отдельных лунок.

Фигура 18: Влияние PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR на секрецию 10 провоспалительных цитокинов в антиген-неспецифическом анализе Т-клеток. PBMC человека субоптимально стимулировали антителом против CD3 в присутствии различных концентраций PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR (трехкратные серийные разведения; в диапазоне от 1 мкг/мл до 0,00015 мкг/мл) или контрольного антитела b12 b12-IgG-FEAL. Уровни цитокинов в супернатантах определяли через 48 часов после добавления антител с помощью мультиплексного сэндвич-иммуноанализа с применением набора MSD V-Plex Human Proinflammatory panel 1 (10-Plex). Каждая точка данных представляет среднее значение ± стандартное отклонение трех отдельных лунок.

Осуществление изобретения

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно связанных

гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких (L) цепей с низкой молекулярной массой и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре цепи связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. Смотри, например, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_H или VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как C_H или CH). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Шарнирная область находится между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи и представляет собой очень гибкую часть молекулы. Дисульфидные связи в шарнирной области представляет собой часть взаимодействия между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L или VL) и константной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как C_L или CL). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или по форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися с областями, которые представляют собой более консервативные, каркасные области (FR). Каждая из VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (смотри также Chothia и Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Если иное не указано или не противоречит контексту, то последовательности CDR в настоящем документе идентифицируют в соответствии с правилами IMGT с применением базы данных DomainGapAlign (Lefranc M.P., *Nucleic Acids Research* 1999;27:209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. и Lefranc M.-P. *Nucleic Acids Res.*, 38, D301-307 (2010); смотри также интернет [http-адрес www.imgt.org/](http://www.imgt.org/)). Если иное не указано или не противоречит контексту, то ссылка на положения аминокислот в константных областях в настоящем изобретении соответствует нумерации EU (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). Например, в SEQ ID NO: 93 в настоящем документе указаны положения аминокислот 118-447 согласно нумерации EU константной области тяжелой цепи IgG1m(f).

Термин «аминокислота, соответствующая положению...», как применен в

настоящем документе, относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи человеческого IgG1. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах могут быть обнаружены путем выравнивания с человеческим IgG1. Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которые «соответствуют» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, представляют собой аминокислоту, которую выравнивают с другой аминокислотой или сегментом с применением стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно с настройками по умолчанию и которые имеют, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичности тяжелой цепи человеческого IgG1. В данной области техники хорошо известно, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить соответствующее положение в последовательности положению аминокислоты согласно настоящему изобретению.

Термин «связывающий агент» в контексте настоящего изобретения относится к любому агенту, способному связываться с желаемыми антигенами. В определенных вариантах осуществления изобретения связывающий агент представляет собой антитело, фрагмент антитела или его конструкцию. Связывающий агент может также включать синтетические, модифицированные или не встречающиеся в природе фрагменты, в частности непептидные фрагменты. Такие фрагменты могут, например, связывать желаемые антигенсвязывающие функциональные группы или области, такие как антитела или фрагменты антител. В одном из воплощений, связывающий агент представляет собой синтетическую конструкцию, включающую антигенсвязывающие CDR или переменные области.

Термин «антитело» (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с заметно продолжительными периодами полураспада, такими как, по меньшей мере, приблизительно 30 минут, по меньшей мере, приблизительно 45 минут, по меньшей мере, приблизительно один час, по меньшей мере, приблизительно два часа, по меньшей мере, приблизительно четыре часа, по меньшей мере, приблизительно 8 часов, по меньшей мере, приблизительно 12 часов, приблизительно 24 часа или более, приблизительно 48 часов или более, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д., или любым другим соответствующим функционально определенным периодом (таким как время, достаточное для индуцирования, стимулирования, усиления и/или модулирования физиологического ответа, вызванного связыванием антитела с антигеном, и/или время,

достаточное для того, чтобы антитело вызвало эффекторную активность). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Термин «антигенсвязывающая область», при применении в настоящем документе, относится к области, которая взаимодействует с антигеном и включает как область VH, так и область VL. Примененный в настоящем документе термин антитело включает не только моноспецифичные антитела, но также и полиспецифичные антитела, которые включают множество, например два или более, например, три или более различных антигенсвязывающих областей. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классический путь активации комплемента. Как указано выше, термин антитело в настоящем документе, если иное не указано или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые представляют собой антигенсвязывающие фрагменты, то есть они сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в WO2007059782 («Genmab»); (ii) F(ab')₂-фрагменты, двухвалентные фрагменты, включающие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и который также называют доменным антителом (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21 (11): 484-90); (vi) молекулы верблюда или нанотел (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24) и (vii) изолированную область, определяющую комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет сконструировать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH образуют пары с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), смотри, например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело, если иное не отмечено или четко не указано в контексте. Хотя такие фрагменты, как правило,

включены в понятие антитела, они вместе и каждый независимо представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрируя различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифические форматы таких фрагментов обсуждают далее в настоящем документе. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), предоставляемые любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, синтез пептида и рекомбинантные способы. Полученное антитело может обладать любым изотипом. Как применен в настоящем документе термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Если конкретный изотип, например, IgG1, упоминают в настоящем документе, то термин не ограничен конкретной последовательностью изотипа, например, конкретной последовательностью IgG1, но его применяют для указания того, что антитело ближе по последовательности к этому изотипу, например, к IgG1, чем к другим изотипам. Так, например, антитело IgG1 по изобретению может представлять собой вариант последовательности встречающегося в природе антитела IgG1, включая вариации в константных областях.

Примененный в настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антитела с одним молекулярным составом. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и сродство к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, обладающим единственной специфичностью связывания, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела могут генерироваться гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, не являющегося человеком, такого как трансгенная мышь, имеющую геном, включающий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Термин «биспецифическое антитело» или «bs» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, имеющему две разные антигенсвязывающие области, определенные различными последовательностями антител. В некоторых вариантах осуществления указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные

эпитопы на одном и том же антигене. Однако в предпочтительных воплощениях указанные разные антигенсвязывающие области связывают разные антигены-мишени. Биспецифическое антитело может быть любого формата, включая любой из форматов биспецифического антитела, описанных в настоящем документе ниже.

При применении в настоящем документе, если это не противоречит контексту, термин «Fab-фрагмент» или «фрагмент» включает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, и его применяют в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полумолекула».

Когда биспецифическое антитело описывают как включающее полумолекулярное антитело, «полученное из» первого антитела, и полумолекулярное антитело, «полученное из» второго антитела, то термин «полученный из» указывает на то, что биспецифическое антитело было получено путем рекомбинации любым известным способом указанных полумолекул от каждого из указанных первого и второго антител в полученное биспецифическое антитело. В этом контексте «рекомбинация» не предназначена для ограничения каким-либо конкретным способом рекомбинации и, таким образом, включает все способы получения биспецифических антител, описанных ниже в настоящем документе, в том числе, например, рекомбинацию путем полумолекулярного обмена, а также рекомбинацию на уровне нуклеиновой кислоты и/или посредством коэкспрессии двух полумолекул в одних и тех же клетках.

Термин «моновалентное антитело» означает в контексте настоящего изобретения, что молекула антитела способна связывать одну молекулу антигена и, следовательно, не способна к перекрестному связыванию антигенов или клеток.

Термин «полноразмерное» при применении в контексте антитела указывает, что антитело не представляет собой фрагмент, но включает все домены определенного изоформа, обычно обнаруживаемые для данного изоформа в природе, например, для антитела IgG1 домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнирный, VL и CL.

При применении в настоящем документе, если это не противоречит контексту, термин «область Fc» относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, где указанные последовательности Fc включают, по меньшей мере, шарнирный участок, домен CH2 и домен CH3.

При применении в настоящем документе термин «гетеродимерное взаимодействие между первой и второй областями CH3» относится к взаимодействию между первой областью CH3 и второй областью CH3 в гетеродимерном белке первый-CH3/второй-CH3.

При применении в настоящем документе, термин «гомодимерные взаимодействия первой и второй областей CH3» относится к взаимодействию между первой областью

СНЗ и другой первой областью СНЗ в гомодимерном белке первый-СНЗ/первый-СНЗ и взаимодействию между второй областью СНЗ и другой второй областью СНЗ в гомодимерном белке второй-СНЗ/второй-СНЗ.

Как применен в настоящем документе, термины «связывание» или «способный к связыванию» в контексте связывания антитела с заранее определенным антигеном или эпитопом обычно представляют собой связывание со средством, соответствующим K_D , равному примерно 10^7 М или менее, например, примерно 10^8 М или менее, например, около 10^9 М или менее, около 10^{10} М или менее, или около 10^{11} М или даже менее, при определении с применением интерферометрии биослоев (BLI) или, например, при определении с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью прибора VIAcore 3000 с применением антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита. Антитело связывается с заранее определенным антигеном со средством, соответствующим K_D , которое, по меньшей мере, в десять раз ниже, например, по меньшей мере, в 100 раз ниже, например, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 100 000 раз ниже, чем его K_D для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близко родственного антигена. Количество, с которым аффинность выше, зависит от K_D антитела, поэтому, если K_D антитела очень низка (то есть антитело представляет собой высокоспецифичное антитело), то степень, в которой средство к антигену ниже, чем средство к неспецифическому антигену, может быть, по меньшей мере, в 10000 раз.

Термин « k_d » (сек^{-1}), как применен в настоящем документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением k_{off} .

Термин « K_D » (М), как применен в настоящем документе относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

В предпочтительном воплощении, антитело по изобретению представляет собой изолированное антитело. Термин «изолированное антитело», как применен в данной публикации, предназначен для обозначения антитела, которое по существу не включает других антител, имеющих различные антигенные специфичности. В предпочтительном воплощении изолированное биспецифическое антитело, которое специфически связывается с PD-L1 и CD137, по существу не включает моноспецифических антител, которые специфически связываются с PD-L1 или CD137. В другом предпочтительном воплощении антитело или фармацевтическая композиция, включающая антитело, по существу не включает естественно возникающих антител, которые не способны

связываться с PD-L1. В дополнительном предпочтительном воплощении антитело по изобретению обладает структурным изменением своей аминокислотной последовательности относительно структуры встречающегося в природе антитела против PD-L1, где указанное структурное изменение приводит к тому, что указанное антитело проявляет измененную функциональность относительно к функциональности, проявляемой указанным природным анти-PD-L1-антителом, причем указанную функциональность выбирают из группы, состоящей из: (i) аффинности связывания PD-L1, (ii) способности ингибировать связывание PD-L1 с PD-1, (iii) способности индуцировать Fc-опосредованные эффекторные функции и (iv) способности не индуцировать Fc-опосредованные эффекторные функции.

Термин «PD-L1», при применении в настоящем документе, относится к лиганду 1 белка программируемой смерти. PD-L1 обнаруживается у людей и других видов, и, таким образом, термин «PD-L1» не ограничивается человеческим PD-L1, если это не противоречит контексту. Последовательности человека, макака (яванский макак), африканского слона, дикого кабана и мыши PD-L1 можно найти через номер доступа в Genbank: NP_054862.1, XP_005581836, XP_003413533, XP_005665023 и NP_068693, соответственно. Последовательность PD-L1 человека также показана в SEQ ID NO: 28, где предсказано, что аминокислоты 1-18 представляют собой сигнальный пептид. Последовательность PD-L1 макака (яванский макак) также показана в SEQ ID NO: 29, где предсказано, что аминокислоты 1-18 представляют собой сигнальный пептид.

Термин «PD-L2» при применении в настоящем документе, относится к лиганду 2 человеческого белка программируемой смерти 1 (номер доступа в Genbank NP_079515).

Термин «PD-1» при применении в настоящем документе, относится к человеческому белку программируемой смерти 1, также известному как CD279.

Термин «CD137», как применен в настоящем документе, относится к белку кластера дифференцировки 137 человека. CD137 (4-1BB), также называемый TNFRSF9, представляет собой рецептор для лиганда TNFSF9/4-1BBL. Считается, что CD137 участвует в активации Т-клеток. В одном из воплощений CD137 – это человеческий CD137, имеющий регистрационный номер UniProt Q07011. Последовательность человеческого CD137 также показана в SEQ ID NO: 30, где предсказано, что аминокислоты 1-23 представляют собой сигнальный пептид. В одном из воплощений CD137 – это CD137 яванского макака (*Macaca flavicularis*), имеющий номер доступа UniProt A9YYE7-1. Последовательность CD137 яванского макака показана в SEQ ID NO: 31, где предсказано, что аминокислоты 1-23 представляют собой сигнальный пептид. CD137 дикого кабана (*Sus scrofa*) показан в SEQ ID NO: 38, где предсказано, что

аминокислоты 1-23 представляют собой сигнальный пептид. CD137 африканского слона (*Loxodonta africana*) показан в SEQ ID NO: 39, где аминокислоты 1-23, как предсказывают, представляют собой сигнальный пептид.

«Антитело против PD-L1» или «анти-PD-L1 антитело» представляет собой антитело, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном PD-L1, в частности с человеческим PD-L1.

«Антитело против CD137» или «анти-CD137 антитело» представляет собой антитело, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном CD137.

«Антитело против CD137xPD-L1», «анти-CD137xPD-L1 антитело», «антитело против PD-L1xCD137» или «анти-PD-L1xCD137 антитело» представляет собой биспецифическое антитело, которое включает две разные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с антигеном PD-L1 и одна из которых специфически связывается с CD137.

Настоящее изобретение также относится к антителам, включающим функциональные варианты областей VL, областей VH или одной или нескольких CDR антител примеров. Функциональный вариант VL, VH или CDR, примененный в контексте антитела, все же позволяет антителу сохранять, по меньшей мере, значительную долю (по меньшей мере, около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности/селективности «эталонного» или «родительского» антитела и в некоторых случаях такое антитело может быть связано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем родительское антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности с родительским антителом. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных позиций, общих для последовательностей (то есть % гомологии = число идентичных позиций/общее число позиций x 100), принимая во внимание число пробелов и длину каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может, например, быть определен с применением алгоритма, приведенного в работе E. Meyers и W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с применением таблица весов замен остатков PAM120, штрафа за длину пробела 12 и штрафа за пробел 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма, приведенного в работе Needleman и Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Типичные варианты включают варианты, которые отличаются от областей VH

и/или VL и/или CDR последовательностей родительского антитела в основном консервативными заменами; например, 10, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из замен в варианте, представляют собой замены консервативных аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены заменами в пределах классов аминокислот, отраженных в следующей таблице:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислотные остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

В контексте настоящего изобретения для описания мутации применяют следующие обозначения, если не указано иное,: i) замену аминокислоты в данном положении записывают, например, как K409R, что означает замену лизина аргинином в положении 409 белка; и ii) для конкретных вариантов применяют конкретные трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и Х для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина аргинином в положении 409 обозначают как: K409R, а замену лизина любым аминокислотным остатком в положении 409 обозначают как K409X. В случае делеции лизина в положении 409 это обозначают как K409*.

В контексте настоящего изобретения «ингибирование связывания PD-L1 с PD-1» относится к любому определяемому значительному снижению связывания PD-L1 с PD-1 в присутствии антитела, способного связывать PD-L1. Как правило, ингибирование означает снижение, по меньшей мере, примерно на 10%, например, по меньшей мере, примерно на 15%, например, по меньшей мере, примерно на 20%, например, по меньшей мере, на 40% снижение связывания между PD-L1 и PD-1, вызванное присутствием антитела против PD-L1. Ингибирование связывания PD-L1 с PD-1 может быть определено любым подходящим способом. В одном из воплощений ингибирование определяют, как описано в примере 6 настоящего документа.

Термин «специфичность», как применен в настоящем документе, должен иметь следующее значение, если это не противоречит контексту. Два антитела имеют «одинаковую специфичность», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом.

Термин «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных группировок

молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахара и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не с последним, пропадает в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокированы или покрыты специфическим антигенсвязывающим пептидом (иными словами, аминокислотный остаток находится в зоне действия специфического антигенсвязывающего пептида).

Термин «химерное антитело», как применен в настоящем документе, относится к антителу, в котором вариабельная область получена из вида, не относящегося к человеку, (например, получена от грызунов), а константная область получена из другого вида, например, из человека. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разработаны для снижения иммуногенности антител. Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен», применяемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина. Химерные антитела могут быть получены с применением стандартных ДНК-технологий, как описано в руководстве Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Химерное антитело может быть генетически или энзиматически сконструированным рекомбинантным антителом. Специалисту в данной области техники известно, как создать химерное антитело, и, таким образом, получение химерного антитела в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнено способами, отличным от описанных в настоящем документе.

Термин «гуманизированное антитело», как применен в настоящем документе, относится к генно-инженерному антителу, не представляющем собой человеческое антитело, которое включает константные домены человеческого антитела и вариабельные домены, происходящие не от человека, модифицированные для обеспечения высокого уровня гомологии последовательности с вариабельными доменами человека. Это может быть достигнуто путем пересадки шести определяющих комплементарность областей (CDR) антитела не от человека, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную акцепторную каркасную область человека (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность родительского антитела, может потребоваться замена остатков каркасной области из

родительского антитела (т.е. антитела, не от человека) в каркасные области человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может включать последовательности CDR, происходящие не от человека, в первую очередь, каркасные области человека, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в аминокислотной последовательности, происходящей не от человека, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно представляют собой обратные мутации, могут быть применены для получения гуманизованного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как сродство и биохимические свойства.

Термин «человеческое антитело», как применен в настоящем документе, относится к антителам, имеющим переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», как применен в настоящем документе, не подразумевает включение антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь или крыса, были привиты на каркасные последовательности человека. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены различными способами, включая обычную методологию моноклональных антител, например, стандартную методику гибридизации соматических клеток по Kohler и Milstein, Nature 256: 495 (1975). Хотя предпочтительны процедуры гибридизации соматических клеток, в принципе, могут быть применены другие способы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или способы фагового дисплея с применением библиотек генов антител человека. Мышиная система представляет собой подходящую животную систему для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела. Получение гибридом в мышах представляет собой очень хорошо отработанную процедуру. Протоколы и способы иммунизации для выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области техники. Партнеры слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния также известны. Таким образом, человеческие моноклональные антитела могут, например, быть получены с применением

трансгенных или трансхромосомных мышей или крыс, несущих части иммунной системы человека, а не мыши или крысы. Соответственно, в одном из воплощений человеческое антитело получают от трансгенного животного, такого как мышь или крыса, несущего последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии вместо последовательностей иммуноглобулина животного. В таких воплощениях антитело происходит из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, введенных животному, но конечная последовательность антитела представляет собой результат того, что указанные последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии дополнительно модифицированы соматической гипермутацией и созреванием аффинности с помощью механизма эндогенных антител животных, смотри, например, Mendez et al. 1997 Nat Genet. 15(2):146-56. Термин «восстанавливающие условия» или «восстанавливающая среда» относится к условию или среде, в которых субстрат, в данном случае остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью станет восстановленным, чем окисленным.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), как применен в настоящем документе, предназначен для обозначения клетки, в которую был введен вектор экспрессии, например, вектор экспрессии, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0 и лимфоцитарные клетки.

Термин «лечение» относится к введению эффективного количества терапевтически активного антитела по настоящему изобретению с целью ослабления, улучшения, прекращения или устранения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума и способность антитела вызывать желательный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела.

Термин «антиидиотипическое антитело» относится к антителу, которое распознает уникальные детерминанты, обычно связанные с антигенсвязывающим сайтом антитела.

Термин «конкурирует» и «конкуренция» относится к конкуренции между первым антителом и вторым антителом к одному и тому же антигену. Альтернативно,

«конкурирует» и «конкуренция» может также относиться к конкуренции между антителом и эндогенным лигандом за связывание с соответствующим рецептором эндогенного лиганда. Если антитело предотвращает связывание эндогенного лиганда с его рецептором, считается, что такое антитело блокирует эндогенное взаимодействие лиганда с его рецептором и, следовательно, конкурирует с эндогенным лигандом. Специалисту в данной области техники хорошо известно, как тестировать конкуренцию антител на связывание с антигеном-мишенью. Так называемый анализ перекрестной конкуренции представляет собой пример такого способа, который может, например, быть выполнен в виде ELISA или с помощью проточной цитометрии. Альтернативно, конкуренция может быть определена с применением интерферометрии биослоев.

Дополнительные аспекты и воплощения изобретения

Как описано выше, в первом аспекте изобретение относится к связывающему агенту, включающему первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, где вторая антигенсвязывающая область ингибирует связывание человеческого PD-L1 с человеческим PD-1.

Такой связывающий агент, таким образом, включает две разные антигенсвязывающие области, одна из которых способна связывать PD-L1, а другая способна связывать CD137.

Как показано авторами настоящего изобретения, связывающий агент по настоящему изобретению может активировать и/или индуцировать пролиферацию в одной клетке путем связывания с CD137, одновременно связываясь с PD-L1 на другой клетке. У людей CD137 экспрессируется на активированных Т-клетках, таких как CD8⁺ Т-клетки и CD4⁺ Т-клетки, тогда как PD-L1 преимущественно экспрессируется на антиген-презентирующих клетках (APC), таких как дендритные клетки или опухолевые клетки. Таким образом, связывающие агенты, такие как биспецифические антитела, согласно настоящему изобретению, способные связывать как CD137, так и PD-L1, способны одновременно связываться с Т-клетками и APC или Т-клетками и опухолевыми клетками. Таким образом, связывающие агенты, такие как биспецифические антитела, согласно изобретению могут опосредовать межклеточное взаимодействие между APC и Т-клетками путем одновременного связывания PD-L1 и CD137 на клетках. Таким образом, это может привести к пролиферации антиген-специфических Т-клеток. Кроме того, связывающие агенты, такие как биспецифические антитела, согласно изобретению могут опосредовать межклеточное взаимодействие между опухолевыми клетками и Т-клетками путем одновременного связывания PD-L1 на опухолевых клетках и CD137 на Т-клетках. Таким

образом, это может привести к дальнейшей активации Т-клеток в присутствии опухолевых клеток путем связывания CD137 на Т-клетке, в то время как связывание PD-L1 на опухолевых клетках приводит к тому, что Т-клетки и опухолевые клетки находятся в непосредственной близости. Таким образом, активация Т-клеток в присутствии опухолевых клеток может привести к усиленному уничтожению опухолевых клеток Т-клетками. Кроме того, способность антигенсвязывающей области PD-L1 связывающего агента по изобретению ингибировать связывание PD-L1 на опухолевых клетках с PD-1 на Т-клетках предотвращает способность опухолевой клетки индуцировать ингибирование Т-клеток и, следовательно, позволяет избежать противоопухолевого эффекта активированной Т-клетки.

Таким образом, связывающий агент, такой как биспецифическое антитело, по настоящему изобретению может быть применен для лечения заболевания, которое может выиграть от повторной активации Т-клеток, такого как рак.

В одном из воплощений изобретения вторая антигенсвязывающая область связывается с человеческим PD-L1, как указано в SEQ ID NO: 28, или его зрелым полипептидом.

В одном из воплощений изобретения вторая антигенсвязывающая область связывается с PD-L1 яванского макака (*Macaca flavicularis*), как указано в SEQ ID NO: 29, или его зрелым полипептидом. Таким образом, связывающие агенты, имеющие антигенсвязывающую область, которая представляет собой кросс-специфическую область как для PD-L1 как человека, так и яванского макака, подходят для доклинических испытаний на яванских макаках.

Различные связывающие агенты, такие как антитела, способные связываться с одним и тем же антигеном, таким как PD-L1, могут связывать разные области указанного антигена. В некоторых случаях связывание одного антитела к PD-L1 с PD-L1 может по-прежнему разрешать связывание другого антитела к PD-L1 с PD-L1. Однако в других случаях связывание одного антитела к PD-L1 с PD-L1 может конкурировать за (блокировать) связывание другого антитела к PD-L1 с PD-L1. Таким образом, конкурентные эксперименты предоставляют информацию о том, где на антигене-мишени связывается антитело, что может повлиять на функциональные эффекты связывания антитела.

В одном из воплощений изобретения вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, не связывается с человеческим PD-L2.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменные области тяжелой

и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого PD-L1 с антителом, включающим:

a. вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 20 и

b. вариабельную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения указанные модифицированные аминокислоты могут представлять собой такую аминокислотную замену, как консервативная аминокислотная замена. В одном из воплощений изобретения в SEQ ID NO: 20 модифицировали вплоть до одной аминокислоты, например, вплоть до одной замены консервативной аминокислоты в SEQ ID NO: 20. В одном из воплощений изобретения модифицировали вплоть до двух аминокислот в SEQ ID NO: 23, например, одна, например, две замены консервативных аминокислот в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого PD-L1 с антителом, включающим:

a. вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область 1, 2 и 3 тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и

b. вариабельную область легкой цепи, включающую области 1, 2 и 3, определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), имеющие последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, DDN и 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание с человеческим PD-L1 с антигенсвязывающей областью, включающей вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, и VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. Антитела, которые конкурируют за связывание с антигеном-мишенью, могут

связывать разные эпитопы на антигене, причем эпитопы настолько близкие друг к другу, что связывание первого антитела с одним эпитопом предотвращает связывание второго антитела с другим эпитопом. В других ситуациях, однако, два разных антитела могут связывать один и тот же эпитоп на антигене и конкурировать за связывание в анализе конкурентного связывания.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью к PD-L1 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, или последовательность, где до двух аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью к PD-L1 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20, и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, или последовательность, где до двух аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, связывается с тем же эпитопом человеческого PD-L1, что и антитело, включающее переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 18, 19 и 20 соответственно или последовательности где вплоть до одной аминокислоты модифицировано в любой из последовательностей HCDR представленных в SEQ ID NO: 18, 19 и 20 и переменную область легкой цепи содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 имеющие последовательности, представленные SEQ ID NO: 22, DDN и 23 соответственно или последовательности где вплоть до двух аминокислот модифицировано в любой из последовательностей LCDR представленных SEQ ID NO: 22, DDN и 23. Тем самым предусмотрены воплощения, которые допускают модификации вплоть до одной аминокислоты по всем трем последовательностям HCDR и вплоть до

лвух аминокислотных модификаций по всем трем LCDR последовательностям в VL.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, связывается с тем же эпитопом человеческого PD-L1, что и антитело, включающее VH, включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17, и VL, включающую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. Таким образом, в одном из воплощений антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, который связывается с тем же эпитопом, что и антитело, включающее специфические последовательности VH и VL, следует понимать как связывающий агент по изобретению и антитело, связывающиеся с теми же аминокислотами на молекуле PD-L1. То, что связывающий агент и антитело или антитела связываются с одним и тем же эпитопом на целевом антигене, может быть определено с помощью стандартных экспериментов по сканированию аланином или экспериментов по кристаллизации антитело-антиген, известных специалисту в данной области техники.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 19.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 18.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, где до трех аминокислот, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы, в общей сложности, по

трем последовательностям HCDR. В одном из воплощений изобретения до трех аминокислот, в общей сложности, модифицированы в трех последовательностях HCDR. В одном из воплощений изобретения до трех аминокислот, в общей сложности, модифицированы в трех последовательностях HCDR. В одном из воплощений вплоть до двух аминокислот модифицированы в одной и той же последовательности HCDR. В одном из воплощений вплоть до двух аминокислот модифицированы в разных последовательностях HCDR. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы, в общей сложности, по трем последовательностям HCDR. В одном из воплощений вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в одной и той же последовательности HCDR. В одном из воплощений вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в различных последовательностях HCDR.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указана в: SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR3, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR2, имеющую последовательность DDN или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицирована в DDN.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую LCDR1, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 22.

В одном из воплощений изобретения указанная вторая антигенсвязывающая

область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в: SEQ ID NO: 22, DDN, 23 соответственно, где вплоть до двух аминокислот, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, в целом модифицированы по всем трем последовательностям LCDR.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности с аминокислотой последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 17.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичности с аминокислотой последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 21.

Так, например, указанная антигенсвязывающая область, способная к связыванию с PD-L1 человека, включает:

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 17 и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO:21, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 100% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 17 и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 100% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO:21.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17.

В одном из воплощений изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21.

В предпочтительном воплощении изобретения, указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с PD-L1 человека, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), в которой VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17, и VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21.

В дополнительном воплощении, каждая из указанных последовательностей VH и VL включает три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, и соответствующие комбинированные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 для VH имеют, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичность аминокислотной последовательности с соответствующими объединенными каркасными последовательностями FR1, FR2, FR3 и FR4 указанных последовательностей VH, и в которых последовательности CDR VH не мутированы, и в которых соответствующие комбинированные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 VL имеют, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или по меньшей мере, 99% идентичность аминокислотной последовательности соответствующим комбинированным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 указанных последовательностей VL, и в которых последовательности VL CDR не мутированы. В контексте данного воплощения %

идентичности относится к процентной идентичности, полученной, когда каркасные последовательности были взяты вместе как одна последовательная последовательность без промежуточных последовательностей CDR.

CD137

Как описано выше, вышеупомянутые связывающие агенты по изобретению включают первое антигенсвязывающее связывание с человеческим CD137. Таким образом, связывающий агент по изобретению может представлять собой биспецифическое антитело, имеющее первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором вторая антигенсвязывающая область ингибирует связывание человеческого PD-L1 с человеческим PD-1.

В одном из воплощений изобретения, первая антигенсвязывающая область связывается с человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 30, или с его зрелым полипептидом.

В одном из воплощений изобретения, первая антигенсвязывающая область связывается с CD137 яванского макака (*Macaca fascicularis*), как указано в SEQ ID NO: 31 или с его зрелым полипептидом. Таким образом, связывающие агенты, имеющие антигенсвязывающую область, которая представляет собой кросс-специфичной для CD137 человека и яванского макака подходят для доклинических испытаний на яванском макаке.

В одном из воплощений изобретения, первая антигенсвязывающая область связывается с человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 30, или с его зрелым полипептидом в большей степени, измеряемой по связыванию клеток с трансфицированными клетками со следующими конструкциями, чем она связывается с мутантным человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 33 или с его зрелым полипептидом. Мутантный человеческий CD137, как указано в SEQ ID NO: 33, (перестановка 5/слон), соответствует аминокислотной последовательности человеческого CD137, в котором аминокислоты 48-88 были заменены соответствующими аминокислотами из CD137 слона. В одном из воплощений изобретения у первой антигенсвязывающей области снижено связывание с мутантным человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 33 (перестановка 5/слон) или с его зрелым полипептидом, по сравнению с человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 30 или с его зрелым полипептидом. В одном из воплощений изобретения первая антигенсвязывающая область не связывается с мутантным человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 33, или с его зрелым полипептидом (перестановка 5/слон). Таким образом, в одном из воплощений

изобретения, первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, связывается с эпитопом человеческого CD137, который расположен в аминокислотной последовательности, определенной положениями 48-88 в SEQ ID NO: 30, соответствующими положениям 25-65 в SEQ ID NO: 41, таким как эпитоп, который включает или требует одну или несколько из аминокислот C, P, P, N, S, F, S, S, A, G, G, Q, R, T, C, D, I, C, R, Q, C, K, G, V, F, R, T, R, K, E, C, S, S, T, S, N, A, E, C, D, C в положениях 48-88 в SEQ ID NO:30, соответствующих положениям 25-65 в SEQ ID NO: 41. Связывание первой антигенсвязывающей области с человеческим CD137 может зависеть от любого из аминокислотных остатков в последовательности аминокислот, определенной положениями 48-88 в SEQ ID NO: 30, соответствующих положениям 25-65 в SEQ ID NO: 41, таких как одна или несколько из аминокислот C, P, P, N, S, F, S, S, A, G, G, Q, R, T, C, D, I, C, R, Q, C, K, G, V, F, R, T, R, K, E, C, S, S, T, S, N, A, E, C, D, C, в положениях 48-88 в SEQ ID NO: 30, соответствующих положениям 25-65 в SEQ ID NO: 41.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область связывания с человеческим CD137 связывается, по меньшей мере, с одной, например, по меньшей мере, с 2, по меньшей мере, с 3, по меньшей мере, с 4 или, по меньшей мере, с 5 аминокислотами в аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:40.

В особенности, и, например, при определении по аланиновому сканированию; например, как будет описано дальше и в примере 13, связывание антитела по изобретению с человеческим CD137 может зависеть от одного или нескольких из следующих аминокислотных остатков: Phe (F) в положении 13, Phe (F) в положении 30, Thr (T) в положении 38, Asp (D) в положении 40 и Asn (N) в положении 60 в SEQ ID NO: 41, соответствующих F36, F53, T61, D63 и N83, соответственно, в SEQ ID NO: 30.

В соответствии с данным воплощением, связывание антитела с мутантным CD137, в котором любой один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 13, 30, 38, 40 и 60 в SEQ ID NO: 41, был/были замещены аланином, снижено по сравнению с CD137 дикого типа, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41. Предпочтительно, сниженное связывание определяют как z-оценка (кратное изменение) указанного антитела, составляющее менее чем 1,5, где z-оценка (кратное изменение) для связывания антител с мутантным CD137 рассчитывают, как указано в примере 13.

Phe (F) в положении 13 и/или Phe (F) в положении 30 может оказывать структурное влияние на эпитоп, без непосредственного участия в связывании антитела. Следовательно, антитело по изобретению может связываться с эпитопом на человеческом CD137, в

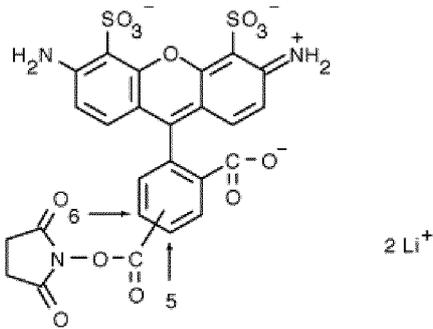
котором Thr (T) в положении 38, Asp (D) в положении 40, и/или Asn (N) в положении 60 в SEQ ID NO: 41 непосредственно участвует/участвуют в связывании антитела.

В другом воплощении связывание антитела по изобретению с человеческим CD137 может зависеть от одного или нескольких из следующих аминокислотных остатков: Leu (L) в положении 1, Gln (Q) в положении 2, Pro (P) в положении 4, Gly (G) в положении 11, Thr (T) в положении 12, Asp (D) в положении 15, Gln (Q) и в положении 20 в SEQ ID NO: 41, соответствующих положениям в SEQ ID NO: 30, соответствующих L24, Q25, P27, G34, T35, D38 и Q43 в SEQ ID NO: 30, соответственно.

В соответствии с данным воплощением, связывание антитела с мутантным CD137, в котором любой один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 1, 2, 4, 11, 12, 15 и 20 в SEQ ID NO: 41 был/были замещены аланином, снижено по сравнению с CD137 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41. Предпочтительно, сниженное связывание определяют как z-оценку (кратное изменение) указанного антитела, составляющее менее чем - 1,5, где z-оценку (кратное изменение) для связывания антител с мутантным CD137 рассчитывают, как указано в примере 13.

Процедура сравнения связывания дикого типа с аланинзамещенным CD137 может включать стадии:

- i) экспрессии CD137 дикого типа и аланинзамещенного в подходящей клеточной линии, такой как клетки HEK293;
- ii) сбора клеток через один день после трансфекции и инкубирование для каждой точки данных образца из 100000 клеток с антителом по изобретению, меченного, например, соединением по формуле I (A488), при комнатной температуре в течение 30 минут в буфере FACS (забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), 1% бычий сывороточный альбумин, 0,02% азид натрия),
- iii) промывания каждого образца буфером FACS и анализ образца с помощью проточной цитометрии и определения среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции (gMFI) для связывания антитела; и
- iv) нормализации данных по интенсивности связывания не перекрестно блокирующего CD137-специфического антитела и вычисления z-оценки (кратного изменения), как описано в примере 13.



Формула I

Как описано в примере 13, данные могут быть нормализованы по отношению к интенсивности связывания специфического контрольного антитела CD137 без перекрестного блокирования, с помощью следующего уравнения:

$$\text{Нормализованная gMFI}_{\text{положение aa}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{gMFI}_{\text{Тестируемое Ab}}}{\text{gMFI}_{\text{Контрольное Ab}}} \right)$$

в котором «aa положение» относится к положению, которое было мутировано в аланин или глицин.

Z-оценка может быть рассчитана в соответствии со следующим вычислением:

$$z - \text{оценка (кратность изменения)} = \frac{\text{Нормализованная gMFI}_{\text{положение aa}} - \mu}{\sigma}$$

где μ и σ представляют собой среднее значение и стандартное отклонение нормализованной gMFI, рассчитанной для всех мутантов.

В одном из воплощений изобретения, первая антигенсвязывающая область связывается с мутантным человеческим CD137, как указано в SEQ ID NO: 34 (перестановка 4/дикий кабан), или с его зрелым полипептидом, в той же степени, в какой она связывается с человеческим CD137, как указано в SEQ ID: NO 30, или с его зрелым полипептидом, при измерении по клеточному связыванию с трансфицированными клетками с помощью конструкций, указанных в SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 30. Мутантный человеческий CD137, как указано в SEQ ID NO: 34 (перестановка 4/дикий кабан) соответствует аминокислотной последовательности человеческого CD137, где аминокислоты 89-114 были заменены соответствующими аминокислотами из CD137 дикого кабана. Таким образом, в одном из воплощений изобретения первая

антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, не связывается с эпитопом CD137 человека, который включает или требует одну или несколько аминокислот в положениях 89-114 SEQ ID: 30.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, конкурирует за связывание с человеческим CD137 с антигенсвязывающей областью, включающей переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, и VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, конкурирует за связывание с человеческим CD137 с антигенсвязывающей областью, включающей переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15, и VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, конкурирует за связывание с человеческим CD137 с антигенсвязывающей областью, включающей переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 49, и VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD137 с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 11, и

b. переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 14.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD137 с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 52 и

b. переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 55.

В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности LCDR3. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности LCDR3. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности LCDR3. В одном из воплощений, вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в последовательности LCDR3.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD137 с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), имеющую

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно, и

b. переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, GAS и 14, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD137 с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно, и

b. переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 54, SAS и 55, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, связывается с тем же эпитопом человеческого CD137, что и антитело, включающее последовательность VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, как указано в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, связывается с тем же эпитопом человеческого CD137, что и антитело, включающее последовательность VH, как указано в SEQ ID NO: 49, и последовательность VL, как указано в SEQ ID NO: 53.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью в отношении CD137 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 14.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая

область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью в отношении CD137 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 52, и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 55.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 11. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR3.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 52. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR3. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR3.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, в которой вплоть до трех, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, аминокислот

модифицированы в SEQ ID NO: 10. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR2. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR2. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR2.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51, или последовательность, в которой вплоть до трех, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, аминокислот, модифицированы в SEQ ID NO: 51. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR2. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR2. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот модифицированы в последовательности HCDR2.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, в которой вплоть до трех, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, аминокислот модифицированы в SEQ ID NO:9. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR1. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR1. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR1.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, или последовательность, в которой вплоть до трех, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, аминокислот модифицированы в SEQ ID NO:50. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности HCDR1. В одном из воплощений изобретения, вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности HCDR1. В одном из воплощений, вплоть до трех аминокислот модифицированы в последовательности HCDR1.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которых последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в целом во всех трех последовательностях HCDR.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которых последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно, в которой вплоть до трех аминокислот, модифицированы в целом во всех трех последовательностях HCDR.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которых последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которых последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота модифицированы в SEQ ID NO: 14.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 55.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая

область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR2, имеющую последовательность GAS или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности GAS. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности GAS.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR2, имеющую последовательность SAS или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот, модифицированы в последовательности SAS. В одном из воплощений изобретения, вплоть до одной аминокислоты модифицированы в последовательности SAS.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота, модифицированы в SEQ ID NO: 13.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую LCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота модифицированы в SEQ ID NO:54.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота модифицированы в целом во всех трех последовательностях LCDR.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано

в SEQ ID NO: 54, SAS, 55, соответственно, в которой вплоть до четырех аминокислот, например, четыре аминокислоты, например, три аминокислоты, например, две аминокислоты, например, одна аминокислота модифицированы в целом во всех трех последовательностях LCDR.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS, 55, соответственно.

В предпочтительном воплощении изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой такие последовательности, как указано в SEQ ID NO: 9, 10, 11, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой такие последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно.

В предпочтительном воплощении изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой такие последовательности, как указано в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой такие последовательности, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS, 55, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по

меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 15. В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 8.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 49.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 12.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере,

90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 53.

Таким образом, например, указанная первая антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD137, включает:

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 70% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 70% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 75% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 75% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 80% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 85% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 95% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16, или

последовательность VH, которая имеет, по меньшей мере, 100% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VH, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая имеет, по меньшей мере, 100% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью VL, указанной в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой последовательность VH включает последовательность, указанной в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой последовательность VH

включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, и последовательность VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 12.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 49.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53.

В одном из воплощений изобретения, указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой последовательность VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 49, и последовательность VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53.

Биспецифические связывающие агенты

Как описано выше, связывающий агент по изобретению включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1. Таким образом, связывающий агент по изобретению может представлять собой мультиспецифический связывающий агент, например, мультиспецифическое антитело или биспецифическое антитело.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

а. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 11 и

б. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR3 s, как указано в SEQ ID NO: 20.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

а. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 10 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 19.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, как указано в SEQ ID NO:9 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, как указано в SEQ ID NO: 18.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

c. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 52 и

d. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 20.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

c. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 51 и

d. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR2, как указано в SEQ ID NO: 19.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, как указано в SEQ ID NO:

50 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, как указано в SEQ ID NO: 18.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 sequences, как указано в SEQ ID NO:9, 10, 11, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 sequences, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 sequences, как указано в SEQ ID NO:50, 51, 52, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 sequences, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 14 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область

легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR2, имеющую последовательность GAS и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR2, имеющую последовательность DDN.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 13 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 22.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

c. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 55 и

d. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 23.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

c. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR2, имеющую последовательность SAS и

d. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR2, имеющую последовательность DDN.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

с. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 54 и

d. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, как указано в SEQ ID NO: 22.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS и 14, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS и 55, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS и 14, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и переменную область легкой цепи

(VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN и 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO:50, 51 и 52, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2, и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS и 55, соответственно, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2, и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN и 23, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO:8 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO: 17.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO: 15 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO: 17.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO:49 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область

антигенсвязывающая область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16 и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:21.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53, и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:21.

В дополнительном воплощении изобретения, связывающий агент представляет собой мультиспецифичное антитело, такое как биспецифическое антитело.

В предпочтительном воплощении изобретения, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент находится в формате полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности, в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает в первую и вторую антигенсвязывающую область, в которой каждая из антигенсвязывающих областей включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) и предпочтительно указанные переменные области, каждая из которых содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Таким образом, CDR в переменных областях тяжелой цепи можно обозначать как HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, а CDR в переменных

областях легкой цепи можно обозначать как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно. Кроме того, каркасные последовательности в переменных областях тяжелой цепи могут быть обозначены как HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, соответственно, а каркасные последовательности в переменных областях легкой цепи могут быть обозначены как LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, соответственно.

Таким образом, в одном из воплощений из мультиспецифического, такого как биспецифическое антитело по изобретению, каждая из антигенсвязывающих областей включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в котором каждая из указанных переменных областей включает три последовательности CDR - CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления биспецифического антитела по изобретению антитело включает две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности, в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает указанную первую антигенсвязывающую область, включающую первую переменную область тяжелой цепи (VH) и первую переменную область легкой цепи (VL), и указанная вторая антигенсвязывающая область включает переменную область второй тяжелой цепи (VH) и переменную область второй легкой цепи (VL).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает тяжелую цепь и переменную область легкой цепи, в которой каждая переменная область включает три определяющих комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасных области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области, которые расположены от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает переменную область тяжелой цепи, в которой определяющие комплементарность область и каркасные области расположены от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3, HFR4.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает переменную область легкой цепи, в которой определяющие комплементарность области и каркасные области расположены от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3, LFR4.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, включает полипептид, в котором полипептид представляет собой тяжелую цепь (HC). В одном из воплощений изобретения тяжелая цепь (HC) включает переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH).

В одном из воплощений изобретения, константная область тяжелой цепи (CH) включает область домена константной области 1 (CH1), шарнирную область, область домена константной области 2 (CH2) и область домена константной области 3 (CH3).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает (i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и дополнительно включающий первую константную область тяжелой цепи (CH), и (ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и дополнительно включающий вторую константную область тяжелой цепи (CH).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает (i) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий первую константную область легкой цепи (CL), и (ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL), и дополнительно включающий вторую легкую цепь константная область цепи (CL).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой антитело, такое как мультиспецифическое, предпочтительно, биспецифическое антитело, включающее первый связывающий фрагмент и второй связывающий фрагмент, в котором

a. первый связывающий фрагмент включает i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и указанную первую константную область тяжелой цепи (CH), и ii) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и указанную первую константную область легкой цепи (CL) и;

b. второй связывающий фрагмент включает iii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и указанную вторую константную область тяжелой цепи (CH), и iv) полипептид, включающий указанную

вторую переменную область легкой цепи (VL) и указанную вторую константную область легкой цепи (CL).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает первую и вторую константную область тяжелой цепи (CH), включающую одну или несколько из области домена константной области 1 (области CH1), шарнирной области, области CH2 и области CH3, предпочтительно, по меньшей мере, шарнирной области, области CH2 и области CH3.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности, в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, представляет собой изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном из воплощений изобретения изотип выбирают из группы, состоящей из человеческого IgG1, человеческого IgG2, человеческого IgG3 и человеческого IgG4.

В одном из воплощений изобретения, первую антигенсвязывающую область получают из антитела кролика. В одном из воплощений изобретения, первую антигенсвязывающую область получают из гуманизированного антитела. В одном из воплощений изобретения, первый связывающий фрагмент получают из полноразмерного антитела. В одном из воплощений изобретения, первый связывающий фрагмент получают из моноклонального антитела. В одном из воплощений изобретения, первый связывающий фрагмент получают из полноразмерного антитела IgG1, λ (лямбда) или IgG1, κ (каппа). В одном из воплощений изобретения, вторую антигенсвязывающую область получают из антитела крысы. В одном из воплощений изобретения, вторая антигенсвязывающая область представляет собой антигенсвязывающую область человека. В одном из воплощений изобретения, вторую антигенсвязывающую область получают из гуманизированного антитела. В одном из воплощений изобретения, второй связывающий фрагмент получают из полноразмерного антитела. В одном из воплощений изобретения, второй связывающий фрагмент получают из моноклонального антитела. В одном из воплощений изобретения, второй связывающий фрагмент получают из полноразмерного антитела IgG1, λ (лямбда) или IgG1, κ (каппа). В одном из воплощений изобретения, первые и вторые антигенсвязывающие области получают из гуманизированных антител. В одном из воплощений изобретения, первые и вторые антигенсвязывающие области представляют собой антитела человека. В одном из воплощений изобретения, первые и вторые связывающие фрагменты получают из полноразмерных антител, например, из полноразмерных антител IgG1, λ (лямбда) или IgG1, κ (каппа). В одном из воплощений изобретения, первые и вторые связывающие фрагменты получают из моноклональных

антител.

В одном из воплощений изобретения, первую антигенсвязывающую область получают из лямбда-IgG1, а вторую антигенсвязывающую область получают из каппа-IgG1.

Антитела, описанные в настоящем документе, включают антитела IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и их комбинации, в которых тяжелые цепи имеют различные изоотипы и/или подклассы. В различных воплощениях антитело представляет собой антитело IgG1, в особенности, изоотип IgG1, каппа или IgG1, лямбда (т.е. IgG1, κ, λ), антитело IgG2a (например, IgG2a, κ, λ), антитело IgG2b (например, IgG2b, κ, λ), антитело IgG3 (например, IgG3, κ, λ) или антитело IgG4 (например, IgG4, κ, λ).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой мультиспецифический связывающий агент, такой как биспецифический связывающий агент. В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой антитело (в частности, мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело), такое как химерное или гуманизованное или человеческое антитело. В одном из воплощений изобретения, связывающий агент находится в формате полноразмерного антитела или фрагмента антитела. В одном из воплощений изобретения, первую антигенсвязывающую область получают из моноклонального антитела. В одном из воплощений изобретения, вторую антигенсвязывающую область получают из моноклонального антитела. В одном из воплощений изобретения, первую антигенсвязывающую область получают из моноклонального антитела и вторую антигенсвязывающую область получают из моноклонального антитела.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1. В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой полноразмерное человеческое антитело IgG1. В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой полноразмерное человеческое антитело IgG1 с одной или несколькими мутациями в константной области.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В воплощениях изобретения, в которых связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело, обе полумолекулы могут быть человеческими, гуманизованными или химерными, или характеристики полумолекул в отношении происхождения последовательности могут отличаться.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую и вторую антигенсвязывающую область, в котором

a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137, получена из от химерного антитела и/или

b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из химерного антитела.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую и вторую антигенсвязывающую область, в котором

a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137, получена из гуманизированного антитела, и/или

b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из гуманизированного антитела.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент включает первую и вторую антигенсвязывающую область, в котором

a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, получена из человеческого антитела, и/или

b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из человеческого антитела.

В предпочтительном воплощении изобретения, связывающий агент включает первую и вторую антигенсвязывающую область, в котором

a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, получена из гуманизированного антитела, и/или

b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из человеческого антитела.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает первую и вторую константную область тяжелой цепи (CH), включающую область CH3 и в которой две области CH3 включают асимметричные мутации.

В предпочтительном воплощении изобретения, связывающий агент, в особенности в форме мультиспецифического антитела, такого как биспецифическое антитело, включает первую и вторую константную область тяжелой цепи (CH), в котором каждая из указанных первой и второй тяжелых цепей включает, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3, в которой в указанной первой константной области тяжелой цепи (CH), по меньшей мере, одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека в соответствии с нумерацией ЕС, замещена, и в указанной второй тяжелой цепи, по меньшей мере, одна из аминокислот в

положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, замещена, и в котором указанные первая и вторая тяжелые цепи не замещены в одинаковых положениях.

Наиболее предпочтительно, (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной первой константной области тяжелой цепи (CH), и аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной второй константной области тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой антитело, такое как мультиспецифическое, предпочтительно, биспецифическое антитело, в котором указанное антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, включающими одни и те же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области тяжелой цепи (CH), включающие шарнирную область и области CH2 и CH3 IgG1 человека. В одном из воплощений изобретения, указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи модифицированы так, чтобы антитело индуцировало Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое представляет собой идентичным антителом, за исключением включения немодифицированной первой и второй тяжелых цепей.

В одном из воплощений изобретения, указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют по связыванию с Fc (Fc γ) рецепторами IgG, связыванию с C1q или по индукции Fc-опосредованного перекрестного связывания FcR.

В предпочтительном воплощении изобретения, указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют по связыванию с C1q.

В одном из воплощений изобретения, указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи были модифицированы таким образом, что связывание C1q с указанным антителом снижается по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно снижается, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95 %, по меньшей мере, на 97% или на 100%, в котором связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ELISA.

В одном из воплощений изобретения, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй константных областей тяжелой цепи одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно. В одном из воплощений изобретения, положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй константных областях тяжелой цепи. В одном из воплощений изобретения, положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU представляют собой F, E и A, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

В еще одном особенно предпочтительном воплощении, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело PD-L1xCD137, включающее первую и вторую константную область тяжелой цепи, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и в которой (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент индуцирует и/или усиливает пролиферацию Т-клеток. В одном из воплощений изобретения, указанные Т-клетки представляют собой CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент активирует передачу сигналов CD137, только когда вторая антигенсвязывающая область связывается с PD-L1.

В одном из воплощений изобретения, пролиферацию Т-клеток измеряют путем совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих специфический рецептор Т-клеток (TCR), с дендритными клетками (DC), представляющими соответствующий антиген в основном комплексе гистосовместимости, который распознается TCR.

В одном из воплощений, указанную индукцию или усиление пролиферации Т-клеток определяют антигенспецифическим анализом, где DC трансфицируют антигеном

клаудин-6, а Т-клетки трансфицируют TCR, который распознает эпитоп, происходящий от клаудина-6, представленный в HLA-A2 на DC. Данный анализ описан в примере 7.

Биспецифический связывающий агент по изобретению может быть способен опосредовать экспансию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в культуре опухолевой ткани человека *ex vivo*. Экспансия TIL может увеличиться в 1,5 или более раз, в 2 или более раз, в 3 или более раз, в 4 или более раз, в 5 или более раз, в 6 или более раз, в 7 или более раз, в 8 раз или более, в 9 или более раз или в 10 или более раз. Экспансия клеток CD3-CD56⁺ естественных киллеров (NK) может быть увеличена, по меньшей мере, в 10 раз, например, по меньшей мере, в 20 раз, по меньшей мере, в 30 раз, по меньшей мере, в 40 раз или, например, по меньшей мере, в 50 раз. Экспансия цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) CD3⁺CD8⁺ может быть как минимум в 2 раза, как минимум в 3 раза, как минимум в 4 раза, как минимум в 5 раз, как минимум в 6 раз или как минимум в 7 раз. Предпочтительно, экспансию TIL определяется как экспансию TIL из образца ткани немелкоклеточного рака легкого человека в ответ на инкубацию с биспецифическим связывающим агентом в концентрации, соответствующей 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл, например, в ответ на инкубацию с биспецифическим связывающим агентом в концентрации, соответствующей 0,1 мкг/мл.

Экспансия TIL может быть определена в анализе, включающем этапы:

- i) предоставление образца резекции, такого как свежий образец резекции опухолевой ткани, и промывание образца в среде для гематопозитических клеток,
- ii) разрезание опухолевой ткани на кусочки диаметром 1-2 мм и получение образца, содержащего два кусочка опухолевой ткани,
- iii) инкубирование образца с биспецифическим связывающим агентом по изобретению в концентрации 0,1 мкг/мл в среде для гемопоэтических клеток, такой как Lonza™ X-VIVO™ 15, с 10%-ным сывороточным альбумином человека, антибиотиками и Proleukin®S (рекомбинантный аналог IL-2 человека; SEQ ID NO: 56) в лунке планшета для тканевых культур при 37°C, 5% CO₂ в течение 72-х часов; при этом, если в образце наблюдают более 25 микрокластеров TIL, то клетки в указанном образце разделяют на 6 образцов и переносят в 6 лунок в планшете для тканевых культур,
- iv) сбор TIL после полного инкубационного периода, равного 10-14 дням, и окрашивание их мечеными антителами против CD3 человека, CD4 человека, CD56 человека и CD8 человека и красителем, который окрашивает нежизнеспособные клетки, таким как аминоактиномицин D; и
- v) анализ каждого образца способом проточной цитометрии.

Биспецифический связывающий агент по изобретению может, в особенности, быть

способен индуцировать размножение $CD40^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), в которых Т-клетки активируют, например, субоптимально активируют, путем инкубации с анти-CD3-антителом, таким как клон UCNT1), предпочтительно, в концентрации от 0,03 до 0,1 мкг/мл и предпочтительно, инкубируют с биспецифическим связывающим агентом по изобретению в концентрации, соответствующей 0,2 мкг/мл. В особенности, процесс определения экспансии Т-клеток может включать стадии:

i) получение РВМС из лейкоцитных слоев здоровых доноров, например, путем выделения в градиенте фиколла,

ii) мечение РВМС с помощью сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) в PBS,

iii) обеспечение образца, включающего 75000 меченных CFSE РВМС и инкубация образца с антителом против CD3, предпочтительно в концентрации от 0,03 до 0,1 мкг/мл, предварительно определенной для каждого донора, концентрации, индуцирующей субоптимальную пролиферацию Т-клеток, и с биспецифическим связывающим агентом по изобретению в концентрации 0,2 мкг/мл, при 37°C, 5% CO₂ в течение четырех дней в среде Дульбекко в модификации Искова с глутамином и дополненной человеческой сывороткой АВ,

iv) окрашивания РВМС мечеными антителами против CD4 человека, CD8 человека, CD56 человека и красителем, который окрашивает нежизнеспособные клетки, таким как 7-аминоактиномицин D; и

v) анализ CSFE в различных субпопуляциях ($CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки) в образцах способом проточной цитометрии.

Форматы антител

Как описано выше, в данной области техники были описаны различные форматы антител. Связывающий агент изобретения в принципе может представлять собой антитело любого изотипа. Выбор изотипа обычно будет определяться желаемыми Fc-опосредованными эффекторными функциями, такими как индукция ADCC, или требованием к антителу, чтобы оно было лишено Fc-опосредованной эффекторной функции («инертное» антитело). IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 представляют собой примеры изотипов. Может быть применена любая из константных областей легкой цепи человека, каппа или лямбда. Эффекторная функция антител настоящего изобретения может быть изменена путем переключения изотипа, например, на антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических применений. В одном из воплощений обе тяжелые цепи антитела представляют собой изотип IgG1, например,

IgG1, к. Необязательно, тяжелая цепь может быть модифицирована в шарнирной области и/или в области CH3, как описано в другом месте в настоящем документе.

Предпочтительно, каждая из антигенсвязывающих областей включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), и при этом каждая из указанных переменных областей включает три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Кроме того, антитело включает две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело IgG1. В другом воплощении, антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG4, предпочтительно со стабилизированной шарнирной областью. Модификации, которые стабилизируют шарнирную область IgG4, такие как мутация S228P в основном шарнире, описаны в данной области техники, смотри, например, работу Labrijn et al., 2009 Nat Biotechnol. 27(8):767-71.

В других воплощениях изобретения, связывающий агент изобретения включает фрагмент антитела, такой как фрагмент Fab' или Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, моновалентное антитело, как описано в WO2007059782 («Genmab»), фрагмент F(ab')₂ фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент dAb, нанотела, полученные от верблюдовых, или нанотела или изолированную определяющую комплементарность область (CDR).

Связывающие агенты изобретения предпочтительно представляют собой человеческие, гуманизированные или химерные антитела. В вариантах осуществления, в которых антитело представляет собой биспецифическое антитело, обе полумолекулы могут быть человеческими, гуманизированными или химерными, или полумолекулы могут отличаться в отношении происхождения последовательности.

Например, в одном из воплощений, связывающий агент, например биспецифическое антитело, включает две полумолекулы, каждая включающая антигенсвязывающую область, в котором

(i) полумолекула(полумолекулы), включающая(включающие) антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, представляет/представляют собой химерные молекулы, и/или

(ii) полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, если присутствует, представляет собой химерную молекулу.

Например, в другом воплощении, биспецифическое антитело включает две полумолекулы, каждая включающая антигенсвязывающую область, в котором

(i) полумолекула(полумолекулы), включающая(включающие) антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1 гуманизирована/гуманизированы, и/или

(ii) полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, если присутствует, гуманизирована.

Например, в дополнительном воплощении, биспецифическое антитело включает две полумолекулы, каждая включающая антигенсвязывающую область, в котором

(i) полумолекула(полумолекулы), включающая(включающие) антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1 происходит/происходят от человека, и/или

(ii) полумолекула включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, если присутствует, происходит от человека.

Таким образом, например, в одном из воплощений, антигенсвязывающая область (области), способная(способные) связываться с человеческим PD-L1, гуманизирована/гуманизированы, и антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD137, если присутствует, гуманизирована.

В другом воплощении изобретения, антигенсвязывающая область(области), способная(способные) связываться с человеческим PD-L1, происходит/происходят от человека, и антигенсвязывающая область, способная связываться с человеческим CD137, если присутствует, происходит от человека.

В дополнительном воплощении, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело, включающее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, и антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, в котором полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, происходит от человека, гуманизирована или представляет собой химерную молекулу, и полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, гуманизирована.

Предпочтительно, полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, происходит от человека, и полумолекула, включающая антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, гуманизирована.

Форматы биспецифического антитела

В данной области техники известно много различных форматов и применений биспецифических антител, которые были рассмотрены в обзорах Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul;20(7):838-47 и MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению не ограничено каким-либо конкретным биспецифичным форматом или способом его получения.

Примеры молекул биспецифического антитела, которые могут быть применены в настоящем изобретении, включают (i) одиночное антитело, которое имеет два фрагмента, включающих разные антигенсвязывающие области; (ii) одноцепочечное антитело, которое обладает специфичностью к двум различным эпитопам, например, посредством двух scFv, связанных тандемом с помощью дополнительного пептидного линкера; (iii) антитело с двумя переменными доменами (DVD-Ig), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) химически связанный биспецифический (Fab')₂ фрагмент; (v) Tandab, которое представляет собой слияние двух одноцепочечных антител, что приводит к четырехвалентному биспецифическому антителу, которое имеет два сайта связывания для каждого из антигенов-мишеней; (vi) флекситело (flexibody), которое представляет собой комбинацию scFv с диателом, что приводит к поливалентной молекуле; (vii) так называемую молекулу «dock and lock», основанную на «домене димеризации и докинга» в протеинкиназе A, которая применительно к Fabs может давать трехвалентный биспецифический связывающий белок, состоящий из двух идентичных фрагментов Fab, связанных с другим Fab-фрагментом; (viii) так называемую молекулу Scorpion, включающую, например, два scFv, слитые с обоими концами Fab-фрагмента человека; и (ix) диатело.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент настоящего изобретения представляет собой диатело или кросс-тело. В одном из воплощений, связывающий агент изобретения представляет собой биспецифическое антитело полученный через контролируемый обмен Fab-фрагментами (такой, как описано в WO2011131746 («Genmab»)).

Примеры разных классов связывающих агентов согласно настоящему изобретению включают, без ограничений: (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СН3 для ускорения гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, в которых каждая из двух сторон молекулы содержит фрагмент Fab или часть фрагмента Fab, по меньшей мере, двух различных антител; (iii) слитые

молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) молекулы слияния Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные ди-антитела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; (v) молекулы слияния Fab, в которых различные слитые вместе Fab-фрагменты, слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диатела и антитела с тяжелой цепью (например, доменные антитела, нанотела), где разные одноцепочечные молекулы Fv или разные диатела или разные антитела с тяжелой цепью (например, доменные антитела, нанотела) слитые друг с другом, или с другим белком или молекулой-носителем, слиты с константными доменами тяжелой цепи, участками Fc или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами домена СНЗ включают, без ограничений, молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO2011069104), так называемые молекулы выступы-во-впадины (Knobs-in-Holes) (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) и электростатически соответствующие молекулы (Amgen, EP1870459 и WO2009089004; «Chugai», US201000155133; Oncomed, WO2010129304), молекулы LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287 (52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012, Nov 1), молекулы DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), сконструированного доменного тела с заменой цепи (SEED) (EMD Serono, WO2007110205), молекулы Biclomics (Merus, WO2013157953), молекулы FcΔAdp (Regeneron, WO201015792), биспецифические молекулы IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), каркасные молекулы Azymetric («Zymeworks»/»Merck», WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), двухвалентные биспецифические антитела (WO2009080254) и молекулы DuoBody® ("Genmab", WO2011131746).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают без ограничений молекулы (DT)-Ig с двойным нацеливанием (WO2009058383), антитело «два в одном» (Genentech; Bostrom et al. 2009. Science 323, 1610–1614.), перекрёстносшитый Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), молекулы Zybody (Zyngenia; LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr; 5 (2): 208-18), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US 7,262,028), κλ-тела («NovImmune», WO2012023053) и CovX-тело (CovX/Pfizer; Doppalapudi, et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501–506).

Примеры слитых молекул IgG включают без ограничений молекулы с двумя переменными доменами (DVD)-Ig (Abbott, US 7,612,181), антитела с двумя доменами с

двойной головкой («Unilever»; Sanofi Aventis, WO20100226923), IgG-подобные биспецифические молекулы (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. *Nat Biotechnol.* 2014 Feb; 32 (2): 191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ; Dimasi et al. *J Mol Biol.* 2009 Oct 30; 393 (3): 672-92) и молекулы BsAb («Zymogenetics», WO2010111625), молекулы HERCULES (Biogen Idec, US007951918), слитые молекулы scFv («Novartis»), слитые молекулы scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и молекулы TvAb («Roche», WO2012025525, WO2012025530).

Примеры слитых молекул Fc включают без ограничений слияния ScFv/Fc (Pearce et al., *Biochem Mol Biol Int.* 1997 Sep; 42 (6): 1179-88), молекулы SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465); «Zymogenetics»/BMS, WO2010111625), молекулы полученные с помощью двойной аффинной ретаргетинговой технологии (Fc-DART) («MacroGenics», WO2008157379, WO2010080538) и двойные (ScFv)₂-Fab молекулы (Национальный исследовательский центр лечения с помощью антител – Китай).

Примеры Fab-слитых биспецифических антител включают без ограничений молекулы F(ab)₂ («Medarex»/AMGEN; Deo et al. *J. Immunol.* 1998 Feb 15; 160 (4): 1677-86.), молекулы двойного действия или Bis-Fab («Genentech», Bostrom и др. 2009. *Science* 323, 1610–1614.), молекулы Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809), двухвалентные биспецифические молекулы («Biotecol», Schoonjans, J. *Immunol.* 2000 Dec 15; 165). (12): 7050-7) и молекулы Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

Примеры антител, основанных на ScFv, диателах и доменных антител, включают без ограничений молекулы привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE) (Micromet, WO2005061547), молекулы тандемного диатела (TandAb) (Affimed) Le Gall et al., *Protein Eng Des Sel.* 2004 Apr; 17 (4): 357-66.), молекулы, полученные с помощью двойной аффинной ретаргетинговой технологии (DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538), молекулы одноцепочечные диател (Lawrence, *FEBS Lett.* 1998 Apr 3; 425 (3): 479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), молекулы слияния ScFv с человеческим сывороточным альбумином (Merrimack, WO2010059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. *Immunol Cell Biol.* 2010 Aug; 88 (6): 667-75), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx, Hmila et al., *FASEB J.* 2010) и доменные антитела с двойным нацеливанием только на тяжелые цепи.

В одном из аспектов, биспецифическое антитело изобретения включает первую последовательность Fc, включающую первую область СН₃, и вторую последовательность Fc, включающую вторую область СН₃, в которой последовательности первой и второй

областей СНЗ различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ более сильное, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ. Более подробные сведения об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлены в WO2011131746 и WO2013060867 («Genmab»), которые тем самым включены в настоящий документ посредством отсылки.

Как описано далее в настоящем документе, стабильное биспецифическое антитело PD-L1xCD137 может быть получено с высоким выходом с применением конкретного способа на основе одного гомодимерного исходного антитела PD-L1 и одного гомодимерного исходного антитела CD137, содержащих только несколько консервативных асимметричных мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положение, выбранное из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи IgG1 человека, и в котором первая и вторая области СНЗ не замещены в одинаковых положениях.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 366 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1. В одном из воплощений аминокислоту в положении 366 в тяжелой цепи человеческого IgG1 выбирают из Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val или Gln.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 368 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 370, 399, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как

определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 370 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 399, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 399 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 405, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 407 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 407 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении 409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, и вторую область СНЗ, которая имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407 в тяжелой цепи человеческого IgG1.

Соответственно, в одном из воплощений биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает последовательности указанных первой и второй областей СНЗ, содержащие асимметричные мутации, *т.е.* мутации в разных положениях в двух областях СНЗ, например, мутацию в положении 405 в одной из областей СНЗ и мутацию в положении 409 в другой области для СНЗ.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 405 и 407. в одном таком воплощении указанная первая область СНЗ содержит аминокислоты, кроме Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409 и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Phe, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys или Leu в положении 405. В дополнительном воплощении указанная первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в позиции 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 405.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает аминокислоту, отличную от Phe, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln Pro, Trp, Tyr, Leu, Met или Cys в положении 405 и Lys в положении 409. В дополнительном воплощении этого указанная первая область СНЗ включает Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 405 и Lys в позиция 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Leu в положении 405 и Lys в положение 409. В дополнительном воплощении настоящего документа указанная первая

область СНЗ включает Phe в положении 405 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, или Cys в положении 405 и Lys в положении 409. В другом воплощении указанная первая область СНЗ включает Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанная вторая область СНЗ включает Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В дополнительном воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409 и указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405. В дополнительном воплощении, указанная первая область СНЗ включает Arg в положении 409, а указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В еще одном дополнительном воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409 и: а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или б) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409 и: а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или б) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Lys в положении 409 и: а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или б) Thr в положении 370 и Leu в положении

405.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ включает Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ включает Ile в положении 350, Thr в положении 370, Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Phe в положении 405, такую как отличная от Phe, Arg или Gly в положении 405; или указанная первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, в положении 407.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, имеющую аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, и вторую область СНЗ, имеющую аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, в положении 407.

В одном из воплощений, биспецифическое антитело изобретения как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях включает первую область СНЗ having a Tyr at position 407 и an amino acid other than Lys, Leu or Met at position 409 и вторую область СНЗ having an amino acid other than Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser or Thr at position 407 и a Lys at position 409.

В одном из воплощений изобретения, биспецифическое антитело, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, включает первую область СНЗ, имеющую Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, и вторую область СНЗ, имеющую аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407, и Lys в позиция 409.

В другом воплощении изобретения, указанная первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn Pro, Trp или Cys, в положении 407. В другом воплощении изобретения, указанная первая область СНЗ содержит

аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409 и указанная вторая область СНЗ содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например, Leu, Met, Gly, Ala, Val Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro Trp, Tyr или Cys, в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro Trp, Tyr или Cys в положении 409 и указанная вторая область СНЗ содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область

СНЗ содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело по изобретению, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, указанная первая область СНЗ содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, и указанная вторая область СНЗ содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении, биспецифическое антитело изобретения как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощениях, первая область СНЗ содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409 и второй области СНЗ содержит

(i) аминокислоту, отличную от Phe, Leu и Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в позиции 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) аминокислоту, отличную от Asp, Cys, Pro, Glu или Gln, например, Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr или Cys, в положении 399 или

(iv) аминокислоту, отличную от Lys, Arg, Ser, Thr или Trp, например, Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr или Cys, в позиции 366.

В одном из воплощений, первая область СНЗ содержит Arg, Ala, His или Gly в положении 409, а вторая область СНЗ содержит

(i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399 или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met или Tyr в положении 366.

В одном из воплощений, первая область СНЗ содержит Arg в положении 409, а вторая область СНЗ содержит

(i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399 или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln в положении 366.

В предпочтительном воплощении изобретения, биспецифическое антитело

включает первую и вторую тяжелую цепь, в которой каждая из указанных первой и второй тяжелых цепей включает, по меньшей мере, шарнирную область, СН2 и СН3 область, в которой (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 представляет собой L в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 представляет собой R в указанной второй тяжелой цепи, или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

В дополнение к указанным выше аминокислотным заменам указанные первая и вторая тяжелые цепи могут включать дополнительные аминокислотные замены, делеции или вставки относительно последовательностей тяжелых цепей дикого типа.

В одном из воплощений изобретения, ни указанная первая, ни указанная вторая последовательность Fc не включает последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в (основной) шарнирной области.

В дополнительном воплощении изобретения, как указанная первая, так и указанная вторая последовательность Fc включает последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в (основной) шарнирной области.

Способы получения биспецифических антител

Традиционные способы, такие как межвидовая гибридизация и способы химической конъюгации (Marvin и Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26: 649), могут быть применены при получении биспецифических антител по изобретению. Совместная экспрессия в клетке-хозяине двух антител, состоящих из разных тяжелых и легких цепей, приводит к смеси возможных продуктов антител в дополнение к желаемому биспецифическому антителу, которое затем можно выделить, например, аффинной хроматографией или подобными способами.

Можно также применять стратегии, способствующие образованию функционального биспецифического продукта при совместной экспрессии различных конструкций антител, например, способ, описанный в работе Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155: 219). Слияние гибридом крыс и мышей, продуцирующих разные антитела, приводит к ограниченному количеству гетеродимерных белков из-за ограниченного спаривания тяжелой/легкой цепи с предпочтительным видом. Другая стратегия, способствующая преимущественному образованию гетеродимеров над гомодимерами, представляет собой стратегию «выступ-во-впадину», в которой выпуклость вводится в

первый полипептид тяжелой цепи и соответствующая полость во втором полипептиде тяжелой цепи, так что выпуклость может быть расположена в полости на границе этих двух тяжелых цепей, чтобы способствовать образованию гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера. «Выпуклости» создают путем замены небольших аминокислотных боковых цепей на границе раздела первого полипептида более крупными боковыми цепями. Компенсаторные «полости», идентичные или сходные по размеру с выпуклостями, создают на границе раздела второго полипептида путем замены больших аминокислотных боковых цепей на более мелкие (патент США 5731168). EP 1870459 («Chugai») и WO 2009089004 («Amgen») описывают другие стратегии, способствующие образованию гетеродимера при коэкспрессии различных доменов антител в клетке-хозяине. В этих способах один или несколько остатков, которые составляют интерфейс СН3-СН3 в обоих доменах СН3, заменяют заряженной аминокислотой, так что образование гомодимера становится электростатически неблагоприятно, а гетеродимеризация электростатически выгодна. В WO2007110205 («Merck») описана еще одна стратегия, в которой различия между доменами СН3 IgA и IgG используют для стимулирования гетеродимеризации.

Другой способ получения биспецифических антител *in vitro* был описан в WO2008119353 («Genmab»), где биспецифическое антитело получали путем обмена «Fab-фрагмента» или «полумолекулы» (обмен тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифическими IgG4- или IgG4-подобными антителами при инкубации в восстанавливающих условиях. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-фрагмента, которые могут включать разные последовательности.

Предпочтительный способ получения биспецифических антител PD-L1xCD137 настоящего изобретения включает способы, описанные в WO2011131746 и WO2013060867 («Genmab»), включающие следующие стадии:

- а) обеспечение первого антитела, включающего Fc-область, причем указанная область Fc включает первую область СН3;
- б) обеспечение второго антитела, включающего вторую Fc-область, указанная Fc-область включает вторую область СН3, при этом первое антитело представляет собой антитело CD137, а второе антитело представляет собой антитело PD-L1, или наоборот;

в котором последовательности указанных первой и второй областей СН3 различны и представляют собой такие последовательности, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СН3 сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СН3;

с) инкубация указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях; и

д) получение указанного биспецифического антитела PD-L1xCD137.

Аналогичным образом, предложен способ получения антитела по изобретению, включающий стадии:

а) культивирование клетки-хозяина, продуцирующей первое антитело, включающее антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, как определено в настоящем документе, и очистку указанного первого антитела от культуры;

б) культивирование клетки-хозяина, продуцирующей второе антитело, включающее в себя антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, как определено в настоящем документе, для очистки указанного второго антитела от культуры;

с) инкубация указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы в цистеинах в шарнирной области произошла изомеризация дисульфидной связи, и

г) получение указанного биспецифического антитела.

В одном из воплощений изобретения, указанное первое антитело вместе с указанным вторым антителом инкубируют в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы в цистеинах в шарнирной области произошла изомеризация дисульфидной связи, в котором гетеродимерное взаимодействие между указанным первым и вторым антителами в полученном гетеродимерном антителе таково, что не происходит обмена Fab-фрагментом при 0,5 mM GSH через 24 часа при 37°C.

Не ограничиваясь теорией, на стадии с) дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях родительских антител восстанавливаются, и полученные цистеины затем способны образовывать дисульфидные связи между тяжелыми цепями с остатками цистеина другой молекулы родительского антитела (первоначально с другой специфичностью). В одном из воплощений данного способа, условия восстановления на стадии с) включают добавление восстановителя, например, восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина (2-МЭА), дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), глутатиона, трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР), L-цистеина и бета-меркаптоэтанола, предпочтительно, восстановитель выбирают из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиетил)фосфина. В дополнительном воплощении, стадия с) включает возвращение к невосстанавливающим или менее восстанавливающим условиям, например, путем удаления восстановителя,

например, путем обессоливания.

Для этого способа может быть применено любое из антител CD137 и PD-L1, описанных выше, включая первое и второе антитела против CD137 и PD-L1, соответственно, включающие первую и/или вторую области Fc. Примеры таких первой и второй областей Fc, включая комбинацию таких первой и второй областей Fc, могут включать любые из описанных выше. В конкретном воплощении, соответственно, первое и второе антитела против CD137 и PD-L1 могут быть выбраны таким образом, чтобы получить биспецифическое антитело, как описано в настоящем документе.

В одном из воплощений данного способа, указанные первое и/или второе антитела представляют собой полноразмерные антитела.

Области Fc первого и второго антител могут иметь любой изотип, включая, без ограничений, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном из воплощений данного способа области Fc обоих указанных первого и второго антител имеют изотип IgG1. В другом воплощении одна из областей Fc указанных антител имеет изотип IgG1, а другая – изотип IgG4. В последнем воплощении результирующее биспецифическое антитело включает Fc-последовательность IgG1 и Fc-последовательность IgG4 и, таким образом, может иметь интересные промежуточные свойства в отношении активации эффекторных функций.

В дополнительном воплощении, один из исходных белков антитела сконструирован так, чтобы не связывать белок А, что позволяет отделить гетеродимерный белок от указанного гомодимерного исходного белка путем пропускания продукта через колонку с белком А.

Как описано выше, последовательности первой и второй областей СНЗ гомодимерных исходных антител различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ. Более подробная информация об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлена в WO2011131746 и WO2013060867 («Genmab»), которые полностью включены в настоящее описание посредством отсылки.

В особенности, стабильное биспецифическое антитело PD-L1xCD137 может быть получено с высоким выходом с применением вышеуказанного способа изобретения на основе двух гомодимерных исходных антител, которые связывают CD137 и PD-L1, соответственно, и содержат только несколько консервативных асимметричных мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

Биспецифические антитела могут быть также получены путем совместной экспрессии конструкций, кодирующих первый и второй полипептиды в одной клетке. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к способу получения биспецифического антитела, при этом указанный способ включает следующие стадии:

а) обеспечение первой конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, включающий первую последовательность Fc и первую антигенсвязывающую область тяжелой цепи первого антитела, указанная первая последовательность Fc включающая первую область СНЗ,

б) обеспечение второй конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, включающий вторую последовательность Fc и вторую антигенсвязывающую область тяжелой цепи второго антитела, указанная вторая последовательность Fc включающая вторую область СНЗ,

в которых последовательности указанных первой и второй областей СНЗ различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ более сильное, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ, и где указанный первый гомодимерный белок имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 405 и 407,

необязательно, в которых указанные первая и вторая конструкции нуклеиновой кислоты кодируют последовательности легкой цепи указанного первого и второго антител

в) коэкспрессия указанных первой и второй конструкций нуклеиновых кислот в клетке-хозяине и

г) получение указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

Материалы и способы получения антител изобретения

В дополнительных аспектах, изобретение относится к материалам и методам рекомбинантного получения антител по изобретению. Подходящие векторы экспрессии, включая промоторы, энхансеры и т.д. и подходящие клетки-хозяева для получения антител, хорошо известны в данной области техники.

Таким образом, в одном из аспектов, обеспечивают конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, как определено в настоящем документе, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность

легкой цепи антитела, включающего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим PD-L1, как определено в настоящем документе.

В одном из воплощений, конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно включает:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, как определено в настоящем документе, и

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающего антигенсвязывающую область, способную связываться с человеческим CD137, как определено в настоящем документе.

В еще одном дополнительном аспекте изобретение относится к вектору экспрессии, включающему конструкции нуклеиновой кислоты, как определено выше в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей связывающий агент в соответствии с любым аспектом или вариантом осуществления, описанным в настоящем документе, или его полипептидную цепь. В другом аспекте изобретение относится к вектору экспрессии, включающему нуклеиновую кислоту.

Вектор экспрессии в контексте настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий вектор, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические векторы нуклеиновых кислот (последовательность нуклеиновой кислоты, включающая подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и векторов фаговой ДНК и вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном из воплощений нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело PD-L1 или CD137, включают в вектор депротенизированной ДНК или РНК, включая, например, элемент линейной экспрессии (как описано, например, в Sykes и Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), вектор уплотненной нуклеиновой кислоты (как описано, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, «midge»-вектор нуклеиновой кислоты минимального размера (как описано, например, в работе Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или в виде осажденной векторной конструкции нуклеиновой кислоты, такой как Ca₃(PO₄)₂-осажденная конструкция (как описано например, WO200046147, Benvenisty и Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978) и Coraro и Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие векторы нуклеиновых кислот и их применение хорошо известны в данной области

техники (смотри, например, US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном из воплощений, вектор подходит для экспрессии антитела PD-L1 и/или антитела CD137 в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают векторы экспрессии, такие как BlueScript («Stratagene»), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), векторы pET («Novagen», Madison WI) и тому подобное.

Вектор экспрессии может также или альтернативно представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно применять любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, включающие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкогольоксидаза и PGH (рассмотрено в F. Ausubel et al., Ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing и Wiley InterScience New York (1987) и Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516, 544 (1987).

Вектор экспрессии может также или альтернативно представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в клетках млекопитающих, например, вектор, включающий глутаминсинтетазу в качестве селективируемого маркера, такой как векторы, описанные в работе Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175.

Нуклеиновая кислота и/или вектор может также включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направлять полипептид, такой как растущая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны в данной области техники и включают лидер секреции или сигнальные пептиды.

Вектор экспрессии может включать или быть связан с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, человеческий промотор/энхансер CMV IE, а также промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV LTR), эффективные поли(A) терминационные последовательности, источник репликации для продукта плазмиды в *E.coli*, ген устойчивости к антибиотикам в качестве селективируемого маркера и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут также включать индуцибельный промотор, в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE.

В одном из воплощений, вектор экспрессии, кодирующий антитело PD-L1 и/или CD137, может быть расположен в клетке-хозяине или животном-хозяине и/или доставлен в клетку-хозяина или животное-хозяина через вирусный вектор.

В еще одном дополнительном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину,

включающей одну или несколько конструкций нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии, указанных выше в настоящем документе.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, которая продуцирует антитело настоящего изобретения, такой как трансфектома.

Примеры клеток-хозяев включают клетки дрожжей, бактерий, растений и млекопитающих, такие как клетки CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0 или лимфоцитарные клетки. Предпочтительная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO-K1.

В одном из воплощений изобретения, клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка.

Например, в одном из воплощений, клетка-хозяин может включать первую и вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, стабильно интегрированную в клеточный геном. В другом воплощении настоящее изобретение обеспечивает клетку, включающую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагида или элемент линейной экспрессии, который включает первую и вторую конструкцию нуклеиновой кислоты, как указано выше.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует антитело к PD-L1, как определено в настоящем документе.

Fc-области

В некоторых воплощениях изобретения, связывающий агент согласно настоящему изобретению включает, в дополнение к антигенсвязывающим областям, область Fc, состоящую из последовательностей Fc двух тяжелых цепей.

Каждая из первой и второй последовательностей Fc может иметь любой изотип, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, но не ограничиваясь этим, и может включать одну или несколько мутаций или модификаций. В одном из воплощений каждая из первой и второй последовательностей Fc имеет изотип IgG4 или получена из него, возможно, с одной или несколькими мутациями или модификациями. В другом воплощении каждая из первой и второй последовательностей Fc имеет изотип IgG1 или получены из него, необязательно, с одной или несколькими мутациями или модификациями. В другом воплощении одна из последовательностей Fc имеет изотип IgG1, а другая – изотип IgG4, или получены из таких соответствующих изотипов, необязательно с одной или несколькими мутациями или модификациями.

В одном из воплощений изобретения, одна или обе последовательности Fc дефицитны по эффекторной функции. Например, последовательность

(последовательности) Fc могут иметь изотип IgG4 или не-IgG4 тип, например, IgG1, IgG2 или IgG3, который мутировал так, что способность опосредовать эффекторные функции, такие как ADCC, была снижена или даже ликвидирована. Такие мутации были описаны, например, в работах Dall'Acqua WF et al., J. Immunol. 177 (2): 1129-1138 (2006) и Hezareh M, J Virol.; 75(24): 2161-12168 (2001). В другом воплощении одна или обе последовательности Fc включают последовательность дикого типа IgG1.

Антитела согласно настоящему изобретению могут включать модификации в Fc-области. Если антитело включает такие модификации, оно может стать инертным или неактивирующим антителом. Термин «инертность», «инертный» или «неактивирующий», как применен в настоящем документе, относится к области Fc, которая, по меньшей мере, не способна связывать любые Fcγ-рецепторы, индуцировать Fc-опосредованное перекрестное связывание FcR или индуцировать FcR-опосредованное перекрестное связывание антигенов-мишеней через две области Fc индивидуальных антител или не способно связывать C1q. Инертность области Fc гуманизированного или химерного антитела CD137 или PD-L1 преимущественно тестируют с применением антитела в моноспецифическом формате.

Можно создать несколько вариантов, чтобы сделать область Fc антитела неактивной для взаимодействий с рецепторами Fcγ (гамма) и C1q для разработки терапевтического антитела. Примеры таких вариантов описаны в настоящем документе.

Таким образом, в одном из воплощений антитела изобретения, указанное антитело включает первую и вторую тяжелую цепь, в которой одна или обе тяжелые цепи модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично, за исключением включения немодифицированных первой и второй тяжелых цепей. Указанная Fc-опосредованная эффекторная функция может быть измерена путем определения путем связывания с Fcγ-рецепторами, путем связывания с C1q или путем индукции Fc-опосредованного перекрестного связывания FcR.

В другом таком воплощении константные последовательности тяжелой и легкой цепей были модифицированы таким образом, что связывание C1q с указанным антителом снижалось по сравнению с немодифицированным антителом, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, 97% или на 100%, в котором связывание C1q определяют с помощью ELISA.

Таким образом, аминокислоты в Fc-области, которые играют доминирующую роль во взаимодействиях с C1q и рецепторами Fcγ, могут быть модифицированы.

Примеры положений аминокислот, которые могут быть модифицированы, например, в изотипном антителе IgG1, включают положения L234, L235 и P331. Их комбинации, такие как L234F/L235E/P331S, могут вызывать значительное снижение связывания с человеческими CD64, CD32, CD16 и C1q.

Таким образом, в одном из воплощений, аминокислота, по меньшей мере, в одном положении, соответствующем L234, L235 и P331, может быть A, A и S, соответственно (Xu et al., 2000, *Cell Immunol.* 200 (1): 16-26; Oganessian et al., 2008, *Acta Cryst. (D64)*: 700-4). Кроме того, аминокислотные замены L234F и L235E могут приводить к участкам Fc с нарушенными взаимодействиями с рецепторами Fc γ и C1q (Canfield et al., 1991, *J. Exp. Med.* (173): 1483-91; Duncan et al., 1988, *Nature* (332): 738-40). Следовательно, в одном из воплощений аминокислоты в положениях, соответствующих L234 и L235, могут быть F и E, соответственно. Замена аминокислоты D265A может снизить связывание со всеми рецепторами Fc γ и предотвратить ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276): 6591-604). Следовательно, в одном из воплощений, в положении аминокислоты, соответствующем D265, может быть A. Связывание с C1q может быть отменено путем изменения позиций D270, K322, P329 и P331. Мутирование этих положений в либо D270A, либо K322A, либо P329A, либо P331A может привести к антителам с дефицитом в активности CDC (Idusogie EE, et al., 2000, *J. Immunol.* 164: 4178-84). Следовательно, в одном из воплощений аминокислоты, по меньшей мере, в одном положении, соответствующем D270, K322, P329 и P331, могут быть A, A, A и A, соответственно.

Альтернативный подход к минимизации взаимодействия области Fc с рецепторами Fc γ и C1q заключается в удалении сайта гликозилирования антитела. Мутирование положения N297, например, в Q, A или E, удаляет сайт гликозилирования, который представляет собой критический сайт для взаимодействий IgG с Fc-гамма рецептором. Следовательно, в одном из воплощений аминокислота в положении, соответствующем N297, может быть G, Q, A или E (Leabman et al., 2013, *MAbs*; 5 (6): 896-903). Другой альтернативный подход для минимизации взаимодействия области Fc с рецепторами Fc γ может быть получен с помощью следующих мутаций; P238A, A327Q, P329A или E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276): 6591-604).

Альтернативно, подклассы человеческих IgG2 и IgG4 считаются естественно скомпрометированными в их взаимодействиях с рецепторами C1q и Fc-гамма, хотя были сообщения о взаимодействиях с Fc γ -рецепторами (Parren et al., 1992, *J. Clin Invest.* 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, *Blood* 113: 3716-3725). Мутации, отменяющие эти остаточные взаимодействия, могут быть сделаны в обоих изотипах, что приводит к уменьшению нежелательных побочных эффектов, связанных со связыванием FcR. Для

IgG2 к ним относятся L234A и G237A и для IgG4, L235E. Следовательно, в одном из воплощений аминокислота в положении, соответствующем L234 и G237 в тяжелой цепи человеческого IgG2, может быть А и А, соответственно. В одном из воплощений аминокислота в положении, соответствующем L235 в тяжелой цепи IgG4 человека, может представлять собой Е.

Другие подходы для дополнительной минимизации взаимодействия с рецепторами Fc γ и C1q в антителах IgG2 включают, описанные в WO2011066501 и в работе Lightle S., et al., 2010, Protein Science (19): 753-62.

Шарнирная область антитела также может иметь значение в отношении взаимодействий с Fc γ рецепторами и комплементом (Brekke et al., 2006, J Immunol. 177: 1129-1138; Dall'Acqua WF, et al., 2006, J Immunol 177: 1129-1138). Соответственно, мутации или делеция шарнирной области могут влиять на эффекторные функции антитела.

Таким образом, в одном из воплощений, антитело включает первую и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, в которой, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй тяжелых цепей иммуноглобулина одна или несколько аминокислот находящихся в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи человеческого IgG1, не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно.

В одном из воплощений, как в первой, так и во второй тяжелой цепи одна или несколько аминокислот в положении, соответствующем положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи человеческого IgG1, не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, в обеих указанных первой и второй тяжелых цепях аминокислота в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, не представляет собой D.

Таким образом, в одном из воплощений изобретения, в обеих указанных первой и второй тяжелых цепях аминокислоту в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, выбираются из группы, состоящей из А и Е.

В дополнительном воплощении изобретения, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй тяжелых цепей аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1, не представляют собой L и L, соответственно.

В конкретном воплощении изобретения, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй тяжелых цепей аминокислоты в положениях, соответствующих

положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой F и E, соответственно.

В одном из воплощений изобретения, в обеих указанных первой и второй тяжелых цепях аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой F и E, соответственно.

В конкретном воплощении изобретения, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй тяжелых цепей аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой F, E и A, соответственно.

В особенно предпочтительном воплощении изобретения, в обеих указанных первой и второй тяжелых цепях аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляют собой F, E и A, соответственно.

В еще одном особенно предпочтительном воплощении изобретения, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело, включающее первую и вторую тяжелую цепь, в которых положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU как первой тяжелой цепи, так и второй тяжелой цепи представляют собой F и E, соответственно, и в которых (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой L и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой R и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

В еще одном особенно предпочтительном воплощении изобретения, связывающий агент представляет собой биспецифическое антитело, включающее первую и вторую тяжелую цепь, в которых положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU как первой тяжелой цепи, так и второй тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и в которых (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой L и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи представляет собой R и

положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи представляет собой L.

Варианты антител, имеющие комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A и, кроме того, мутацию K409R или F405L, обозначают в настоящем документе суффиксом «FEAR» или «FEAL», соответственно.

В предпочтительном воплощении, биспецифическое антитело изобретения включает:

(i) полу-молекула антитела, полученная из IgG1-CD137-FEAL, и полу-молекула антитела, полученная из IgG1-PDL1-547-FEAR, или

(ii) полу-молекула антитела, полученная из IgG1-CD137-FEAR, и полу-молекула антитела, полученная из и полу-молекула антитела, полученная из IgG1-PD-L1-547-FEAL.

В дополнительном воплощении изобретения, одно или оба антитела, образующие часть биспецифического антитела, были разработаны для уменьшения или увеличения связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), чтобы манипулировать периодом полувыведения биспецифического антитела из сыворотки. Способы увеличения или уменьшения периода полураспада в сыворотке хорошо известны в данной области техники. Смотрите, например, работы Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24; Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176:346-56; и Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28:157-9.

Конъюгаты

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает антитела, которые связаны или конъюгированы с одной или несколькими терапевтическими составляющими, такими как цитокин, иммуностимулятор, иммуностимулирующая молекула и/или радиоизотоп. Такие конъюгаты упоминаются в настоящем документе как «иммуноконъюгаты» или «лекарственные конъюгаты». Иммуноконъюгаты, которые включают один или несколько цитотоксинов, называются «иммунотоксинами».

В одном из воплощений, первая и/или вторая последовательность Fc конъюгирована с лекарством или пролекарством или содержит акцепторную группу для него. Такая акцепторная группа может, например, представлять собой неприродную аминокислоту.

Композиции

В одном из аспектов, изобретение относится к композиции, включающей связывающий агент (такой как биспецифическое антитело), нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии или клетку в соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе воплощений или аспектов. В одном из воплощений изобретения композиции представляет собой фармацевтическую композицию. В одном из воплощений изобретения композиция

дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей связывающий агент (такой как мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело), нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии или клетку-хозяина в соответствии с любым из раскрытых в настоящем документе воплощений и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может включать один связывающий агент (такой как одно мультиспецифическое, предпочтительно, биспецифическое антитело) настоящего изобретения или комбинацию различных связывающих агентов (таких как мультиспецифические, таких как биспецифические антитела) настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут быть составлены в соответствии с общепринятыми методиками, такими как раскрытые в руководстве Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может, например, включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенное детергент, такой как Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белков аминокислоты), консерванты, тканевые фиксаторы, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства для изотоничности, антиоксиданты, средства замедляющие абсорбцию, и тому подобное, которые физиологически совместимы со связывающим агентом (например, мультиспецифическое, такое как биспецифическое антитело), нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии или клетку-хозяина настоящего изобретения. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть применены в фармацевтических композициях настоящего изобретения, включают воду, физиологический раствор, фосфатный буферный раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, применяя такие материалы для покрытия, как лецитин, путем

поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с помощью поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут включать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут также включать изотонические агенты, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия, в композициях.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут также включать одно или несколько вспомогательных лекарственных веществ, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства, диспергирующие средства, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Связывающие агенты (такие как мультиспецифические, такие как биспецифические антитела) настоящего изобретения могут быть получены с носителями, которые будут защищать связывающий агент от быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту отдельно или вместе с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области техники. Способы приготовления таких составов обычно известны специалистам в данной области техники.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или с комбинацией ингредиентов, например, как указано выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем микрофильтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты,

например, из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций в качестве примеров способов приготовления можно привести вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), с помощью которых получают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьировать для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций настоящего изобретения или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарства, соединения и/или материалы, применяемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, настоящее состояние, общее состояние здоровья и предыдущая история болезни пациента, получающего лечение, и тому подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтическая композиция может быть введена любым подходящим путем и способом.

В одном из воплощений, фармацевтическую композицию настоящего изобретения вводят парентерально. Термин «вводят парентерально», как применен в настоящем документе, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутричерепную, внутригрудную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

В одном из воплощений, эту фармацевтическую композицию вводят путем внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

Применения

В одном из аспектов, изобретение относится к связывающему агенту согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или к нуклеиновой кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к связывающему агенту согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или к нуклеиновой кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе, для применения при лечении заболевания, такого как рак.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение эффективного количества связывающего агента согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или нуклеиновой кислоты, вектора экспрессии, клетки-хозяина или фармацевтической композиции как раскрыто в настоящем документе нуждающемуся в этом субъекту.

В особенности, связывающие агенты в соответствии с изобретением могут быть полезными в таких схемах лечения, в которых желательно специфическое нацеливание и уничтожение Т-клеток, которые экспрессируют PD-L1, и они могут быть более эффективными по сравнению с обычным антителом против PD-L1 при некоторых таких показаниях и схемах лечения.

Связывающие агенты изобретения также имеют дополнительную применимость в терапии и диагностике различных заболеваний, связанных с PD-L1. Например, связывающие агенты (в особенности, антитела) может быть применены для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или нескольких из следующих биологических активностей: для ингибирования роста и/или дифференцировки клетки, экспрессирующей PD-L1; для уничтожения клетки, экспрессирующей PD-L1; для опосредования фагоцитоза или ADCC клетки, экспрессирующей PD-L1, в присутствии эффекторных клеток человека; для опосредования CDC клетки, экспрессирующей PD-L1, в присутствии комплемента; для опосредования апоптоза клетки, экспрессирующей PD-L1; и/или для индукции транслокации в липидные рафты при связывании PD-L1. В другом аспекте изобретение относится к способу лечения заболеваний, включающему введение связывающего агента, нуклеиновой кислоты, вектора экспрессии, клетки или композиции в соответствии с любым воплощением, раскрытым в настоящем документе. В одном из воплощений способ относится к лечению заболевания, при котором заболевание представляет собой рак.

В одном из аспектов, изобретение относится к связывающему агенту согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или к нуклеиновой кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе, для применения в лечении рака.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к связывающему агенту согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или к нуклеиновой

кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе для применения в лечении ракового заболевания, характеризующегося наличием солидных опухолей.

В одном из воплощений изобретения, связывающий агент, нуклеиновую кислоту, вектор экспрессии, клетку или композицию, как раскрыто в настоящем документе, предназначены для применения при лечении рака или в способе лечения рака, в котором рак характеризуется наличием солидных опухолей, или рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к связывающему агенту согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений, или к нуклеиновой кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе для применения в лечении ракового заболевания, которое выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака головного мозга, глиомы, рака надпочечников, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака яичников, эндометриоидный рак, рак простаты, рак полового члена, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы Меркеля и мезотелиомы.

В конкретном воплощении, рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

В дополнительном аспекте, изобретение относится к применению связывающего агента согласно любому из раскрытых в настоящем документе воплощений или к нуклеиновой кислоте, вектору экспрессии, клетке-хозяину или фармацевтической композиции, как раскрыто в настоящем документе, для производства лекарственного средства, такого как лекарственное средство для лечения рака, например, ракового заболевания, характеризующегося наличием солидных опухолей, или ракового заболевания, которое выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

В одном из воплощений изобретения, способ или применение согласно любому воплощению, раскрытому в настоящем документе, включает комбинацию с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтическое средство.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического антитела согласно любому воплощению, раскрытому в настоящем документе, включающему следующие стадии:

а. культивирование клетки-хозяина, продуцирующей первое антитело, включающее антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и, возможно, очистку указанного первого антитела от культуры;

б. культивирование клетки-хозяина, продуцирующего второе антитело, включающее антигенсвязывающую область, связывающуюся с PD-L1 человека, и, возможно, очистку указанного второго антитела от культуры;

с. инкубацию указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи, и

д. получение указанного биспецифического антитела CD137хPD-L1.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования роста и/или пролиферации одной или нескольких опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, и/или индукции уничтожения и/или удаления одной или нескольких опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, включающему введение, нуждающемуся в этом индивидууму, связывающего агента (например, биспецифического антитела) настоящего изобретения или композиции настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему

а) выбор субъекта, страдающего раком, включающего опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L1 и

б) введение субъекту связывающего агента (например, биспецифическое антитело) настоящего изобретения или фармацевтической композиции настоящего изобретения.

Режимы дозировки в вышеуказанных способах лечения и применениях корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут вводиться с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как указано, в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки.

Эффективные дозировки и схемы дозирования для связывающего агента зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области техники. Примерный, неограничивающий диапазон для

терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения составляет около 0,001-10 мг/кг, например, около 0,001-5 мг/кг, например, около 0,001-2 мг/кг, например, около 0,001-1 мг/кг, например, около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг. Другой примерный, неограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества связывающего агента (например, биспецифического антитела) настоящего изобретения составляет около 0,1-100 мг/кг, например, около 0,1-50 мг/кг, например, около 0,1-20 мг/кг, например, примерно 0,1-10 мг/кг, например, примерно 0,5, например, примерно 0,3, примерно 1, примерно 3, примерно 5 или примерно 8 мг/кг.

Лечащий врач или ветеринар обычной квалификации в данной области техники, может легко определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, лечащий врач или ветеринар может начать с дозы связывающего агента (например, биспецифического антитела), применяемого в фармацевтической композиции, с уровнем ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Как правило, подходящей суточной дозой связывающего агента (например, биспецифического антитела) настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое представляет собой самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Введение может, например, быть парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное. В одном из воплощений, связывающие агенты (например, биспецифические антитела) могут быть введены с помощью инфузии в еженедельной дозировке, рассчитанной в мг/м². Такие дозы могут, например, быть основаны на дозировках мг/кг, представленных выше, в соответствии со следующим: доза (мг/кг) x 70:1,8. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например, от 3 до 5 раз. Введение может быть выполнено путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 часов, например, от 2 до 12 часов. В одном из воплощений, связывающие агенты (например, биспецифические антитела) могут быть введены путем медленного непрерывного вливания в течение длительного периода, например, в течение, более чем на 24-х часов, чтобы уменьшить токсические побочные эффекты.

В одном из воплощений, связывающий агент может быть введен в еженедельной дозировке, рассчитанной в виде фиксированной дозы, до 8 раз, например от 4 до 6 раз, когда вводится один раз в неделю. Такой режим может быть повторен один или несколько раз по мере необходимости, например, через 6 месяцев или 12 месяцев. Такие фиксированные дозы могут, например, быть основаны на указанных выше дозировках в мг/кг, с оценкой массы тела 70 кг. Дозировка может быть определена или

скорректирована путем измерения количества связывающего агента (например, биспецифического антитела) настоящего изобретения в крови при введении, например, путем отбора биологического образца и применения антиидиотипических антител, которые нацелены на антигенсвязывающую область антигена PD-L1 антител настоящего изобретения.

В одном из воплощений, связывающий агент может быть назначен в качестве поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев и более.

Связывающий агент также может быть назначен профилактически для снижения риска развития рака, отсрочки наступления события в развитии рака и/или уменьшения риска рецидива, если рак находится в стадии ремиссии.

Связывающие агенты изобретения также могут быть введены в комбинированной терапии, то есть в сочетании с другими терапевтическими средствами, относящимися к заболеванию или состоянию, подлежащему лечению. Соответственно, в одном из воплощений, лекарственное средство, содержащее связывающий агент (например, биспецифическое антитело), предназначено для комбинирования с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, такими как цитотоксическое, химиотерапевтическое или антиангиогенное средство.

В одном из аспектов, изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с первой и/или второй антигенсвязывающей областью, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощений.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с CD137-связывающей областью, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощений.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с PD-L1-связывающей областью, как определено в любом из раскрытых в настоящем документе воплощений.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие объем изобретения.

Последовательности

Таблица 1

SEQ ID	НАИМЕНОВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	VH_b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWV RQAPGQRFEGWGMWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTAD TSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQ DNY Y MDVWVGKGTIVVSS

2	VH_b12-CDR1	GYRFSNFV
3	VH_b12-CDR2	INPYNGNK
4	VH_b12-CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
5	VL_b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISRSRRVAWYQH KPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK
6	VL_b12-CDR1	HSIRSRR
	VL_b12-CDR2	GVS
7	VL_b12-CDR3	QVYGASSYT
8	VH_CD137-009	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVR QAPGKGLEWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTV DLKMTSLTTEDTATYFCARGGLTYGF DL WGPGTLVTV SS
9	VH_CD137- 009_CDR1	GFSLNDYW
10	VH_CD137- 009_CDR2	IDVGGSL
11	VH_CD137- 009_CDR3	ARGGLTYGF DL
12	VL_CD137-009	DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQ KPGQRPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISD LESADAATYYCHYYATISGLGVAFGGGTEVVVK
13	VL_CD137- 009_CDR1	EDISSY
	VL_CD137- 009_CDR2	GAS
14	VL_CD137- 009_CDR3	HYYATISGLGVA
15	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWV RQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDS KSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGF DL WGQG TLVTVSS
9	VH_CD137-009- H7_CDR1	GFSLNDYW
10	VH_CD137-009- H7_CDR2	IDVGGSL
11	VH_CD137-009- H7_CDR3	ARGGLTYGF DL
16	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDISSYLAWYQQ KPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTF T ISS LQPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK
13	VL_CD137-009- L2_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009- L2_CDR2	GAS
14	VL_CD137-009- L2_CDR3	HYYATISGLGVA
17	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWV RQAPGKGLEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDDS KNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWG QGTLVTVSS

18	VH-PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA
19	VH-PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT
20	VH-PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
21	VL-PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNIGSKSVHWYQQK PGQAPVLVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFVGGGTKLTVL
22	VL-PD-L1-547-CDR1	NIGSKS
	VL-PD-L1-547-CDR2	DDN
23	VL-PD-L1-547-CDR3	QVWDS SSDHVV
24	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Каппа-С	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	Лямбда-С	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
28	PD-L1 человека	MRIFAVFIFTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMT IECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLK VQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPV TSE HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREE KLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE LPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
29	PD-L1 макака	яванского
		MRIFAVFIFTIYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTI ECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKV QHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYR CMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPV TSEH ELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTNSKREEK LLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPEL PLALPPNERTHLVILGAIFLLGVALTFIFYLRKGRMMD MKKCGIRVTNSKKQRDTQLEET
30	CD137 человека	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRLQDPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK

		KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
31	PD-L1 яванского макака	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODLC SNCPAGTFCD NNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECD CISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFL ALTSTVVLFFLFFLVLRFVVKRSRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
32	CD137 человека перестановка 6 (аминокислоты 24-47 CD137 дикого кабана)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCG <u>KNIQELCMPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRK</u> ECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELT KKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNG TKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF FLALTSTALLGGCEL
33	CD137 человека перестановка 5 (аминокислоты 48-88 CD137 африканского слона)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPLNSFSSTGGQMNCMDCRKCEGVFKTK <u>RACSPTRDAECECTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQEL</u> TKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVN GTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
34	CD137 человека перестановка 4 (аминокислоты 89- 114 CD137 дикого кабана)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKE CSSTSNAECD CVPGFRCLGAGCAMCEEYCQOQGOELTQ KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
35	CD137 человека перестановка 3 (аминокислоты 115- 138 CD137 дикого кабана)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK <u>EGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLDGKSVLVNGT</u> KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
36	CD137 человека перестановка 2 (аминокислоты 139- 161 CD137 дикого кабана)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLAGKPVLMNGT <u>KARDVVCGPRPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISF</u> FLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
37	CD137 человека перестановка 1 (аминокислоты 162- 186 CD137 дикого кабана)	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCD NNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSP TDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHIISFF LALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE

		GGCEL
38	CD137 дикого кабана	MGNNGYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFC GKNIQELCMPCPSNSFSSTSGQKACNVCRKCEGVFRTK KECSSTSNAVCECVPGFRCLGAGCAMCEEYCQQGQEL TQEGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTDCSLAGKPVLMN GTKARDVVCGRPRTDFSPGTPSTTMPVPGGEPGHTSHV IIFFLALMSTAVFVLVSYLALRFSVVQQGRKKLLYIVKQ PFLKPAQTVQEEDACSCRFPEEEEEGECEL
39	CD137 африканского слона	MGNNGYYNMVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGT YCVKNESQICSPCLNSFSSTGGQMNCMDCRKCEGVF KTKRACSPTRDAECECVSGFHCLGAGCTMCQQDCKQ GQELTKEGCKDCCLGTFNDQKNGICRPWTNCSLEGKS VLANGTKKRDRVCGPPAADSFPDTSSTVPAPERKPD HHPQIITFFLALISAALLFLVFFLVVRFVAKWGRKKLL YIFKQPFQVQTAQEEDGCSCRFPEEEEEGDCEL
40	CD137 человека аминокислоты 48-88	CPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAE DC
1	CD137 человека (зрелый белок)	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTC DICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS MCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTP PAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC EL
2	VH-CD137- MOR7480-FEAR	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVR QMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYCYARGYGIFDYWGQGLV TVSS
3	VH-CD137- MOR7480- FEAR_CDR1	GYSFSTYW
4	VH-CD137- MOR7480- FEAR_CDR2	IYPGDSYT
5	VH-CD137- MOR7480- FEAR_CDR3	ARGYGIFDY
6	VL-CD137-MOR7480 (лямбда)	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQK PGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL
7	VL-CD137- MOR7480_CDR1	NIGDQY
	VL-CD137- MOR7480_CDR2	QDK
8	VL-CD137- MOR7480_CDR3	ATYTGFGSLAV
9	VH-CD137-005-FEAR	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFTISDFHVTWVRQ APGKGLEWIGTIITSASTTAYATWARGRFTISKSSTTVN LKIVSPTTEDTATYFCARSTYTDTSGYFFDFWGQGLV TVSS

0	VH-CD137-005- FEAR_CDR1	GFTISDFH
1	VH-CD137-005- FEAR_CDR2	IITSASTT
2	VH-CD137-005- FEAR_CDR3	ARSTYTDTS GY YFDF
3	VL-CD137-005 (каппа)	AQVLTQTASPVSAAVGGTVIINCQSSQSIYNGNRLSWY QQKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKGS GS GTQFTLAI SDVQSDDAATYYCLGSYDCDSADCFAFGGGTEVVVE
4	VL-CD137-005_CDR1	QSIYNGNR
	VL-CD137-005_CDR2	SAS
5	VL-CD137-005_CDR3	LGSYDCDSADCFA
6	Рекомбинантный аналог интерлейкина человека (Proleukin® (альдеслейкин))	MYRMQLLS CIAL SLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FY MPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMSEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
7	MPDL3280A VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIH WY RQAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG QGTLVTVSS
8	MPDL3280A VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RV TITCRASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GS SGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение антитела CD137

Антитела CD137-005 и CD137-009 получали, как описано в примере 1 в WO2016/110584. Коротко, кроликов иммунизировали смесью белков, содержащих слитый белок CD137 человека-Fc. Одиночные В-клетки крови отсортировывали и проводили скрининг на продуцирование специфических антител к CD137 с помощью ELISA и проточной цитометрии. Из В-клеток, положительных на скрининг, выделяли РНК и проводили ее секвенирование. Вариабельные области тяжелой и легкой цепи были синтезированы на генах, и их клонировали в вектор экспрессии IgG1 каппа человека или вектор экспрессии IgG1 лямбда человека, включая тяжелую цепь IgG1 человека, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и F405L (FEAL) или F405L (FEAL), где номер положения аминокислоты соответствует нумерации ЕС (соответствует SEQ ID NO: 25). Последовательности вариабельной области химерного

антитела против CD137 (CD137-009) показаны в перечне последовательностей SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 12 в настоящем документе.

Пример 2: Гуманизация кроличьего (химерного) антитела против CD137

Гуманизированные последовательности антитела из анти-CD137-009 кролика получали с помощью прибора Antitope (Кембридж, Великобритания). Гуманизированные последовательности антитела получали с помощью технологии гуманизации зародышевой линии (CDR-прививка). Гены гуманизированной V-области были сконструированы на основе зародышевой линии человека с наиболее близкой гомологией к аминокислотным последовательностям VH и Vκ антител кролика. Были разработаны серии из семи VH и трех Vκ (VL) генов гуманизированных V-областей зародышевой линии. Структурные модели V-областей родительского антитела, происходящего не от человека, были получены с применением швейцарского PDB и проанализированы для выявления аминокислот в каркасах V-области, которые могут быть важны для свойств связывания антитела. Данные аминокислоты были отмечены для включения в один или несколько вариантов CDR-привитого антитела. Последовательности зародышевой линии, примененные в качестве основы для гуманизированных конструкций, показаны в таблице 2.

Таблица 2: Последовательности, наиболее близко соответствующие V-сегменту и J-сегменту зародышевой области человека.

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь (κ)	
	V-Сегмент зародышевой области человека	J-Сегмент зародышевой области человека	V-Сегмент зародышевой области человека	J-Сегмент зародышевой области человека
Анти-CD137-009 кролика	hIGHV3-49*04	hIGHJ4	hIGKV1-33*01	IGKJ4

Затем были выбраны варианты с наименьшей частотой потенциальных Т-клеточных эпитопов с применением запатентованных технологий Antitope *in silico*, iTope™ и TCED™ (база данных Т-клеточных эпитопов) (Perry, L.C.A, Jones, T.D. and Baker, M.P. New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development (2008). *Drugs in R&D* 9 (6): 385-396; 20 Bryson, C.J., Jones, T.D. and Baker, M.P. Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins (2010). *Biodrugs* 24 (1):1-8). Наконец, нуклеотидные последовательности сконструированных вариантов были оптимизированы по кодонам.

Вариабельная область последовательности гуманизированного антитела CD137 (CD137-009-NC7LC2) показана в перечне последовательностей SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 в настоящем документе.

Пример 3: Перестановка ДНК между CD137 дикого кабана или CD137 слона и CD137 человека для определения доменов, важных для связывания антитела против CD137

Для определения доменов, важных для связывания антитела против CD137 с человеческим CD137, проводили перестановку ДНК между CD137 человека и дикого кабана (*sus scrofa*; XP_005665023) или между CD137 человека и африканского слона (*loxodonta africana*; XP_003413533). Конструкции с перестановкой получали из ДНК, кодирующей человеческий CD137, путем замены доменов человека доменами дикого кабана (конструкция с перестановкой 1-4, б) или слона (конструкция с перестановкой 5). Аминокислотная последовательность конструкций с перестановкой приведена в таблице 1.

Если домен в человеческом CD137 важен для связывания антитела против CD137, то связывание будет потеряно при замене этого домена доменом дикого кабана или африканского слона.

Гомология между человеком и кабаном, а также между человеком и африканским слоном CD137 составляет 70,2 и 74,5%, соответственно. Требование к выбору этих двух видов состояло в том, что представляющая интерес область африканского слона и дикого кабана была достаточно отличной от человеческой, что приводило к потере связывания, в то же время, сохраняя критические структурные взаимодействия, которые необходимы для минимизации риска неправильного сворачивания или потери экспрессии. Фигура 1 показывает выравнивание последовательностей CD137 человека, кабана и африканского слона. Фигура 2 показывает конструкции для человеческого CD137, содержащие CD137 дикого кабана или домены CD137 африканского слона, как указано.

Клеток НЕК293Т-17 в количестве 3×10^6 высевали в культуральные колбы T75 («Greiner Bio-One», кат. № 658175) в 20 мл среды RPMI 1640 GlutaMAX, содержавшей 10% FCS («Biochrom», кат. № S 0115). После O/N-инкубации клетки были временно трансдуцированы экспрессирующими векторами, кодирующими конструкции с перестановкой или CD137 дикого кабана, африканского слона или человека, расположенные ниже конститутивно активного промотора фактора элонгации-1 альфа (EF-1 альфа) человека, с применением реагента для трансфекции TransIT®-LT1, Mirus Bio («VWR International», кат. № 731-0029), в соответствии с инструкциями производителя. На

следующий день клетки собирали с применением 1,5 мл аккутазы («Sigma Aldrich», кат. № А6964) (инкубация при 37°C в течение 5 минут) и анализировали с помощью проточной цитометрии, по существу, как описано выше, для измерения поверхностной экспрессии конструкций с перестановкой и CD137 человека, африканского слона и дикого кабана и для измерения связывания клонов антител с различными конструкциями с перестановкой. Для измерения экспрессии на клеточной поверхности конструкций, трансдуцированные клетки инкубировали с 1 мкг/мл козьего поликлонального антитела против CD137 человека («R&D Systems», кат. № AF838) в буфере FACS (4°C, 20 мин) с последующей инкубацией с меченым APC против козьего IgG (H+L) («R&D Systems», кат. № F0108) (4°C, 20 мин). Связывание различных клонов антител CD137 с клетками, экспрессирующими конструкции с перестановкой, измеряли путем инкубации трансдуцированных клеток с 1 мкг/мл клонов антител, а затем с меченым APC фрагментом AffiniPure F(ab')₂ (конечное разведение 1:50; «Jackson», кат. № 109-136-127).

Все конструкции с перестановкой CD137, а также CD137 человека, африканского слона и дикого кабана, были экспрессированы на поверхности клеток с одинаковыми уровнями экспрессии (фигура 3).

Фигура 4 показывает, что CD137-009 продемонстрировал потерю связывания с CD137 африканского слона и дикого кабана. CD137-009 также продемонстрировал потерю связывания с конструкцией с перестановкой 5, по сравнению со связыванием с человеческим CD137.

Пример 4: Получение антитела PD-L1

Иммунизацию и генерацию гибридомы проводили в Aldevron GmbH (Фрайбург, Германия). кДНК, кодирующую аминокислоты 19-238 человеческого PD-L1, клонировали в патентованные плазмиды экспрессии Aldevron. Антитело PD-L1-547 получали путем иммунизации животных OmniRat (трансгенных крыс, экспрессирующих разнообразный репертуар антител с полностью человеческими идиотипами; «Ligand Pharmaceuticals Inc.», Сан-Диего, США) путем нанесения частиц золота, покрытых кДНК PD-L1 человека, применяя ручное устройство для бомбардировки частицами («генная пушка»). Образцы сыворотки собирали после серии иммунизаций и тестировали проточной цитометрией на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеуказанными экспрессионными плазмидами для экспрессии человеческого PD-L1. Антителообразующие клетки выделяли и сливали с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами. РНК из гибридом, продуцирующих специфическое антитело к PD-L1, экстрагировали и проводили секвенирование. Варибельные области тяжелой и легкой цепи (SEQ ID NO: 17 и 21) синтезировали генетически и клонированы в лямбда-вектор

экспрессии человеческого IgG1, включавший тяжелую цепь человеческого IgG1, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и K409R (FEAR), в которой номер положения аминокислоты соответствует нумерации ЕС (соответствует SEQ ID NO: 24).

Пример 5: Генерация биспецифических антител путем 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-фрагмента

Биспецифические антитела IgG1 генерировали путем обмена Fab-фрагмента в условиях контролируемого восстановления. В основе этого способа лежит применение комплементарных доменов СН3, которые способствуют образованию гетеродимеров в конкретных условиях анализа, как описано в WO 2011/131746. Мутации F405L и K409R (нумерация ЕС) были введены в соответствующие антитела для создания пар антител с комплементарными доменами СН3.

Для получения биспецифических антител два родительских комплементарных антитела, каждое из которых брали в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЭА) в общем объеме 100 мкл PBS при 31°C в течение 5-ти часов. Реакцию восстановления останавливали, удаляя восстановитель 2-МЕА с помощью спин-колонок (центрифужный фильтр Microcon, 30k, «Millipore») в соответствии с протоколом производителя.

Биспецифические антитела были получены путем объединения следующих антител из примера 1 и 4:

- антитело CD137-009-FEAL в сочетании с антителом PD-L1-547-FEAR
- антитело PD-L1-547-FEAL в сочетании с CD137-009-FEAR
- антитело PD-L1-547-FEAL в сочетании с антителом CD137-009-HC7LC2-FEAR,
- антитело b12-FEAL в сочетании с антителом PD-L1-547-FEAR, с антителом CD137-009-FEAR или с антителом CD137-009-HC7LC2-FEAR, применяя в качестве первого фрагмента антитело b12, которое представляет собой специфическое антитело gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23)
- PD-L1-547-FEAL или CD137-009-FEAL с антителом b12-FEAR.

Пример 6: Влияние антитела PD-L1 на взаимодействие PD-1/PD-L1

Влияние моновалентного антитела PD-L1 b12-FEALxPD-L1-547-FEAR на взаимодействие PD-1 и PD-L1 определяли в биоанализе ингибирования PD-1/PD-L1, разработанном «Promega» (Madison, США). Этот анализ представляет собой биолюминесцентный клеточный анализ, состоящий из двух генно-инженерных клеточных

линий: эффекторных клеток PD-1, которые представляют собой Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и репортер люциферазы, управляемый отвечающим элементом NFAT (NFAT-RE), и клеток PD-L1 аAPC/CHO-K1, которые представляют собой клетки CHO-K1, экспрессирующие человеческий PD-L1 и сконструированный белок клеточной поверхности, предназначенный для активации когнатных TCR антиген-независимым образом. Если эти два типа клеток культивируют совместно, то взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует передачу сигналов TCR и NFAT-RE-опосредованную люминесценцию. Добавление антитела, которое блокирует взаимодействие PD-1/PD-L1, высвобождает ингибирующий сигнал и приводит к активации TCR и NFAT-RE-опосредованной люминесценции.

Клетки PD-L1 аAPC/CHO-K1 («Promega», кат. № J109A) оттаивали в соответствии с протоколом производителя, ресуспендировали в среде Хэма F12 («Promega», кат. № J123A), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS; «Promega», кат. № J121A), и помещали в 96-луночные планшеты с плоским дном для культивирования (CulturPlate-96, «Perkin Elmer», кат. № 6005680). Планшеты инкубировали в течение 16-ти часов при 37°C, 5% CO₂. Супернатант удаляли и добавляли серийные разведения антител (конечная концентрация в диапазоне от 5 до 0,001 мкг/мл; 4-кратные разведения в RPMI 1640 [«Lonza», кат. № BE12-115F], содержавшие 1% фетальную бычью сыворотку [FBS; «Promega», cat № J121A]). Добавляли эффекторные клетки PD-1 («Promega», кат. № J115A; оттаивали в соответствии с протоколом производителя и ресуспендировали в RPMI/1% FBS). Планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37°C, 5% CO₂. После уравнивания до комнатной температуры, в каждую лунку добавляли по 40 мкл реагента Bio-Glo (субстрат для анализа люциферазы Bio-Glo [«Promega», кат. № G720B] восстанавливали в буфере для анализа люциферазы Bio-Glo [«Promega», кат. № G7198] в соответствии с протоколом производителя). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 минут и измеряли люминесценцию с применением EnVision Multilabel Reader («PerkinElmer»). Влияние на взаимодействие PD1-PD-L1 относительно контроля (без добавления антител) рассчитывали следующим образом:

Кратность индукции = $RLU \text{ (индуцированный)} - \text{фон} / RLU \text{ (без контроля на антитело)} - \text{фон}$,

RLU – относительные световые единицы

Фигура 5 показывает, что моновалентное антитело b12-FEALxPD-L1-547-FEAR эффективно ингибирует взаимодействие PD1-PD-L1.

Пример 7: Антиген-специфический анализ пролиферации CD8⁺ Т-клеток для измерения эффектов путем связывания биспецифических антител с PD-L1 и CD137

Схематическое представление ожидаемого способа действия биспецифических антител CD137хPD-L1 показано на фигуре 6.

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток с помощью биспецифического антитела, нацеленного на PD-L1 и CD137, в антиген-специфическом анализе, дендритные клетки (DC) трансфицировали *in vitro*-транскрибированной РНК (IVT-РНК) клаудина-6 для экспрессии антигена клаудина-6. Т-клетки трансфицировали IVT-РНК PD-1 и клаудин-6-специфичным рецептором Т-клеток, ограниченным по HLA-A2 (TCR). Этот TCR может распознавать эпитоп, происходящий от клаудина-6, презентированный в HLA-A2 на DC. Биспецифическое антитело CD137хPD-L1 может перекрестно связывать PD-L1, эндогенно экспрессируемый на дендритных клетках, происходящих из моноцитов, или на опухолевых клетках, и CD137 на Т-клетках, что приводит к ингибированию ингибирующего взаимодействия PD-1/PD-L1 и в то же время к кластеризации CD137, что приводит к пролиферации Т-клеток. Кластеризация рецептора CD137, экспрессируемого на Т-клетках, приводит к активации рецептора CD137, который тем самым доставляет костимулирующий сигнал к Т-клетке.

HLA-A2⁺ мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали от здоровых доноров (Transfusionszentrale, Университетская клиника, Майнц, Германия). Моноциты были выделены из PBMC способом активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) с применением анти-CD14 MicroBeads («Miltenyi»; № кат. 130-050-201) в соответствии с инструкциями производителя. Лимфоциты периферической крови (PBL, CD14-негативная фракция) были заморожены для будущей изоляции Т-клеток. Для дифференциации в незрелые ДК (iDCs) 1×10⁶ моноцитов/мл культивировали в течение пяти дней в RPMI GlutaMAX («Life technologies GmbH», кат. № 61870-044), содержащей 5% сыворотки АВ человека («Sigma-Aldrich» Chemie GmbH, № по кат. H4522-100ML), пируват натрия («Life technologies GmbH», кат. № 11360-039), незаменимые аминокислоты («Life technologies GmbH», кат. № 11140-035), 100 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин («Life technologies GmbH», кат. № 15140-122), 1000 МЕ/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF; «Miltenyi», кат. № 130-093-868) и 1000 МЕ/мл интерлейкина-4 (IL)-4; «Miltenyi», кат. № 130-093-924). Один раз в течение этих пяти дней половину среды заменяли свежей средой. iDC собирали путем сбора неадгезивных Т-клеток, а адгезивные Т-клетки отделяли инкубацией с PBS, содержащим 2 мМ ЭДТА, в течение 10 мин при 37°. После отмывки iDC замораживали в RPMI GlutaMAX, содержащей 10% объем/объем. ДМСО

(AppliChem GmbH, кат. № A3672,0050) + 50% объем/объем человеческой сыворотки АВ для будущих антиген-специфических анализов Т-клеток.

За один день до начала анализа антиген-специфической пролиферации Т-клеток CD8⁺ замороженные PBL и iDC от того же донора оттаивали. Т-клетки CD8⁺ выделяли из PBL по технологии MACS с применением анти-CD8 MicroBeads («Miltenyi», кат. № 130-045-201) в соответствии с инструкциями производителя. Около 10-15 × 10⁶ CD8⁺ Т-клеток подвергали электропорации с 10 мкг *in vitro* транслированной (IVT)-РНК, кодирующей альфа-цепь, плюс 10 мкг IVT-РНК, кодирующей бета-цепь клаудин-6-специфического мышиного TCR (HLA-A2-рестриктированного; описано в WO 2015150327 A1) плюс 10 мкг IVT-РНК, кодирующей PD-1, в 250 мкл X-Vivo15 («Biozym Scientific GmbH», кат. № 881026) в 4-мм кювете для электропорации («VWR International GmbH», кат. № 732-0023) с применением устройства системы электропорации BTX ECM® 830 (BTX; 500 В, импульс 1 × 3 мс). Сразу после электропорации клетки переносили в свежую среду IMDM («Life technologies GmbH», кат. № 12440-061) с добавлением 5% сыворотки АВ человека и оставляли при 37°C, 5% CO₂, по меньшей мере, на 1 час. Т-клетки метили с применением 1,6 мкМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE; «Invitrogen», кат. № C34564) в PBS в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в среде IMDM с добавлением 5% сыворотки АВ человека, O/N.

До 5 × 10⁶ оттаявших iDC электропорировали с 5 мкг IVT-РНК, кодирующей полноразмерный клаудин-6, в 250 мкл среды X-Vivo15, применяя систему электропорации, как описано выше (300 В, импульс 1x12 мс), и инкубировали в среде IMDM с добавлением 5% человеческой сывороткой АВ, O/N.

На следующий день клетки собирали. Экспрессию на клеточной поверхности клаудина-6 и PD-L1 на DC и TCR и PD-1 на Т-клетках проверяли с помощью проточной цитометрии. DC окрашивали конъюгированным с Alexa647 CLDN6-специфическим антителом (доступно не на коммерческой основе; собственное производство) и антителом против человеческого CD274 (PD-L1, «eBiosciences», кат. № 12-5983), и Т-клетки окрашивали антителом против β-цепи TCR мыши («Becton Dickinson GmbH», кат. № 553174) и антителом против человеческого CD279 (PD-1, «eBiosciences» кат. № 17-2799). 5000 электропорированных DC инкубировали с 50000 электропорированными, меченными CFSE Т-клетками в присутствии биспецифических или контрольных антител в IMDM GlutaMAX с добавлением 5% сыворотки АВ человека в 96-луночном круглодонном планшете. Пролиферацию Т-клеток измеряли через 5 дней с помощью проточной цитометрии. Детальный анализ пролиферации Т-клеток на основе пиков CFSE, указывающих на деление клеток, выполняли с помощью программного обеспечения

FlowJo. В результате, термин «% разделившихся клеток» указывает на процент клеток, которые перешли в деление, а термин «индекс пролиферации» указывает среднее число делений клеток, которые перешли в деление.

Моновалентное PD-L1-контрольное антитело, имеющее один нерелевантный связывающий фрагмент, b12-FEALxPD-L1-547-FEAR, в определенной степени усиливало пролиферацию Т-клеток по сравнению с инкубацией с b12 (в качестве обычного IgG1), и биспецифическое антителом CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR вызывало сильную пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (фигура 7). Это было отражено как увеличением процента разделившихся клеток (фигура 7B и D, левые панели), так и увеличением индекса пролиферации (фигура 7B и D, правые панели).

Кроме того, в этом анализе было определено значение EC₅₀ для CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR. С этой целью биспецифическое антитело анализировали при 3-кратном серийном разведении от 1 до 0,00015 мкг/мл (фигура 8). Процент разделившихся клеток и индекс пролиферации определяли с помощью программного обеспечения FlowJo. Кривые анализировали с помощью нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-ответ с переменным наклоном) с применением программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Значения EC₅₀ индукции антиген-специфической пролиферации Т-клеток CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR составляли 0,003492 мкг/мл для «% разделившихся клеток» и 0,005388 мкг/мл для «индекса пролиферации».

Пример 8: Сравнение биспецифического антитела, нацеленного на PD-L1 и CD137, с комбинацией двух моновалентно связывающихся антител CD137 и PD-L1 или двух родительских антител (PD-L1-547 + CD137-009) в антиген-специфическом анализе Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток с помощью биспецифического антитела, нацеленного на PD-L1 и CD137, был проведен антиген-специфический анализ пролиферации Т-клеток с активной осью PD1/PD-L1 (общая схема анализа аналогична примеру 7). Вкратце, 5 000 электропорированных клаудин-6-IVT-РНК DC инкубировали с 50000 клаудин-6-специфичными, TCR- и PD1-IVT-РНК-электропорированными, мечеными CFSE Т-клетками, в присутствии биспецифических или контрольных антител в IMDM GlutaMAX с добавлением 5% сыворотки АВ человека в 96-луночном круглодонном планшете. Пролиферацию Т-клеток измеряли через 5 дней с помощью проточной цитометрии. Детальный анализ пролиферации Т-клеток на основе пиков CFSE, указывающих на деление клеток, выполняли с применением программного обеспечения FlowJo. В результате, термин «% разделившихся клеток» указывает на процент клеток,

которые перешли в деление, а термин «индекс пролиферации» указывает на среднее количество делений клеток, которые перешли в деление.

Ни моновалентное контрольное антитело CD137, CD137-009-FEALxb12-FEAR, имеющее один нерелевантный связывающий фрагмент, ни соответствующее двухвалентное родительское антитело CD137-009 не влияло на пролиферацию Т-клеток по сравнению с IgG1-b12. Напротив, инкубация с одновалентным контрольным антителом PD-L1, а также с двухвалентным родительским антителом (b12-FEALxPD-L1-547-FEAR и PD-L1-547, соответственно) приводила к умеренно усиленной пролиферации Т-клеток по сравнению с инкубацией с контрольным антителом IgG1-b12. Сравнимый уровень пролиферации Т-клеток был обнаружен при инкубации с комбинированными моновалентными контрольными антителами (CD137-009-FEALxb12-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) и комбинированными соответствующими родительскими антителами (CD137-009 + PD-L1-547). Напротив, биспецифическое антитело CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR вызывало сильную пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, которая превосходила пролиферацию, вызываемую обоими комбинированными контролями (моновалентным и двухвалентным) (фигура 9). Это отразилось как в увеличении доли разделившихся клеток (фигура 9B), так и в увеличении индекса пролиферации (фигура 9C).

Пример 9: *Ex vivo* анализ экспансии ТИЛ для оценки влияния биспецифического антитела CD137xPD-L1 на инфильтрирующие опухоль лимфоциты.

Для оценки действия CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR на инфильтрирующие опухоль лимфоциты (ТИЛ), *ex vivo* культивирование опухолевой ткани человека выполняли следующим образом. Свежие образцы резекции опухолевой ткани человека трижды промывали путем переноса с помощью шпателя или серологической пипетки изолированных кусков опухоли из одной лунки 6-луночного планшета («Fisher Scientific», кат. № 10110151), содержащей промывочную среду, в следующую лунку. Среды для промывки состояла из X-VIVO 15 («Biozym», кат. № 881024) и была дополнена 1% Pen/Strep («Thermo Fisher», кат. № 15140-122) и 1% Fungizone («Thermo Fisher», кат. № 15290-026). Затем опухоль иссекали хирургическим ножом («Braun/Roth», кат. № 5518091 BA223) и разрезали на куски диаметром около 1-2 мм. Два кусочка каждого помещали в одну лунку 24-луночного планшета («VWR international», кат. № 701605), содержащую 1 мл среды TIL (X-VIVO 15, 10% человеческий сывороточный альбумин (HSA, «CSL Behring», кат. № PZN-6446518), 1% Pen/Strep, 1% фунгизон и дополненной 10U/мл IL-2 (Proleukin®S, «Novartis Pharma», кат. № 02238131)). CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR

добавляли в указанных конечных концентрациях. Культуральные планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 72 часа в каждую лунку добавляли по 1 мл свежей среды TIL, содержащей указанную концентрацию биспецифического антитела. Через день лунки контролировали с помощью микроскопа на наличие кластеров TIL. Лунки переносили по отдельности, когда в соответствующей лунке было обнаружено более 25 микрокластеров TIL. Для разделения культур TIL клетки в лунках 24-луночного планшета ресуспендировали в 2 мл среде и переносили в лунку 6-луночного планшета. В каждую лунку дополнительно вносили еще по 2 мл среды TIL.

После общего периода культивирования, равного 10-14 дням, TIL собирали и анализировали проточной цитометрией. Клетки окрашивали следующими реагентами, все разводили 1:50 в буфере для окрашивания (D-PBS, содержащий 5% FCS и 5 mM EDTA), анти-CD4-FITC человека («Miltenyi» Biotec, кат. № 130-080-501), анти-CD3-PE-Cy7 человека (BD Pharmingen, кат. № 563423), 7-аминоактиномицин D (7-AAD, «Beckman Coulter», кат. № A07704), анти-CD56-APC человека («eBioscience», кат. № 17-0567-42) и анти-CD8-PE человека (TONBO, кат. № 50-0088). Для количественного сравнения полученных клеток между различными группами обработки, клеточные осадки ресуспендировали после последней стадии промывания в FACS-буфере, дополненном BD™ CompBeads («BD biosciences», кат. № 51-90-9001291). Проточный цитометрический анализ проводили на проточном цитометре BD FACSCanto™ II («Becton Dickinson»), а полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo 7.6.5. Относительное количество жизнеспособных TIL, количество CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, количество CD3⁺CD4⁺ Т-клеток и количество CD3⁺CD56⁺ NK-клеток на 1000 бусинах, коррелирующих с соответствующей лункой в 6-луночном планшете, рассчитывали путем нормализации полученной 7AAD-отрицательной клеточной фракции на количество полученных бусин.

Фигура 10 показывает анализ экспансии TIL из образца ткани немелкоклеточного рака легкого человека. Здесь были добавлены следующие концентрации CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR: 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл; образец ткани от того же пациента без добавления антител служил отрицательным контролем. После 10 дней культивирования TIL собирали и анализировали проточной цитометрией. Было измерено пять образцов (из 5 исходных лунок) для каждой концентрации антител, полученных из разных лунок 24-луночного планшета. Во всех образцах, культивируемых с биспецифическим антителом, количество жизнеспособных TIL было значительно увеличено по сравнению с контрольными образцами без антител. В целом, наблюдали до 10-кратного увеличения экспансии жизнеспособных TIL, если в культуры добавляли 0,1 мкг/мл CD137-009-

FEALxPD-L1-547-FEAR (фигура 10 А). Экспансия $CD3^+CD4^+$ Т-хелперных клеток была незначительной (фигура 10 С; 2,8-кратная экспансия), тогда как, напротив, наиболее выраженную экспансию ТИЛ наблюдали для $CD3^+CD56^+$ НК-клеток (фигура 10 D; до 64-кратное увеличение экспансии по сравнению с контролем). Также наблюдали сильное влияние на $CD3^+CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) (фигура 10 В; 7,4-кратная экспансия по сравнению с контролем).

Пример 10: Влияние суррогатного биспецифического мышинового антитела, связывающегося с mPD-L1 и mCD137, на пролиферацию овалбумин-специфических Т-клеток у мышей C57BL/6 после переноса адоптивных Т-клеток OT-I CD8⁺

Суррогатные мышинные биспецифические антитела mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 и mPD-L1-MPDL3280Axb12 были получены с применением способа генерации мышинных биспецифических антител на основе контролируемого обмена Fab-фрагментом (Labrijn et al., 2017 Sci Rep. 7(1): 2476 и WO2016097300).

Моноклональное антитело 3H3, которое связывается с 4-1BB мыши, было получено из BioXcell (кат. № BE0239) и секвенировано с помощью ProtTech. Предполагаемую последовательность кДНК выводили с применением собственных способов. Варибельные области тяжелой и легкой цепи синтезировали на генах и клонировали в вектор экспрессии мышинового IgG2a, включавший константную область мышинового IgG2a, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234A, L235A, F405L и R411T. Аналогично, в этот вектор экспрессии клонировали варибельные области b12.

Описано, что антитело MPDL3280A (варибельные последовательности тяжелой и легкой цепей, приведенные в SEQ ID NO: 57 и 58, соответственно) связывает PD-L1 человека и мыши. Варибельные области тяжелой и легкой цепей этого антитела были клонированы в вектор экспрессии мышинового IgG2a, включавший константную область мышинового IgG2a, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234A, L235A, T370K и K409R.

Биспецифические мышинные (в основном химерные крыса-человек-мышь) антитела были получены путем обмена Fab-фрагмента в условиях контролируемого восстановления, как описано выше.

Самок мышей C57BL/6JOlaHsd («Envigo RMS GmbH», Россдорф, Германия), в возрасте 6-8 недель, весом от 17 до 24 г, акклиматизировали в виварии в течение не менее шести дней до включения в исследование. Этих мышей применяли в качестве реципиентов. Самок или самцов мышей C57BL/6 Thy1.1 x C57BL/6J OT-1, гомозиготных

по аллелю OT-1 и Thy1.1, размножала компания, проводящая исследование (скрещивали мышей C57BL/6-Tg (Tcr α Tcr β) 1100Mjb/Cr1 и B6.PL-Thy1a/CyJ) и применяли в качестве доноров. Мыши имели свободный доступ к пище (ssniff M-Z, автоклавируемый Soest, Германия) и стерильной воде, и их содержали при 12-часовом цикле свет/темнота при 22°C \pm 2°C с относительной влажностью 55% \pm 15%.

В день начала исследования мышей-доноров C57BL/6 Thy1.1 x C57BL/6J OT-1 умерщвляли и выделяли селезенки. Селезенки механически разрушали, а эритроциты лизировали путем повторного суспендирования осадка спленоцитов буфером для лизиса эритроцитов (8,25 г/л NH $_4$ Cl, 1 г/л KHCO $_3$, 0,1 mM EDTA, pH 7). Затем спленоциты промывали PBS (DPBS) Дульбекко, CD8 $^+$ Т-клетки выделяли, применяя MicroBeads CD8a (Ly-2), мышь в сочетании с разделителем autoMACS Pro (оба «Miltenyi Biotec GmbH», Bergisch Gladbach, Германия). CD8 $^+$ /OT-1 $^+$ /Thy1.1 $^+$ Т-клетки (2,5-5 x 10 5 клеток) инъецировали ретроорбитально в общем объеме 200 мкл на мышь-реципиента C57BL/6JOlaHsd. На следующий день после переноса адоптивных клеток мышей-реципиентов «вакцинировали» ретроорбитально с помощью 100 мкг овальбумина/200 мкл PBS в качестве антигенного стимула. Через 6 часов мышей обрабатывали ретроорбитально соответствующим биспецифическим антителом. Подробнее, мышам вводили 100 мкг или 20 мкг mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A, mCD137-3H3xb12 или mPD-L1-MPDL3280Axb12 антитела. Инъекцию простого PBS применяли в качестве исходного стандарта, а необработанных животных (мышей, которые получали только донорские клетки) применяли в качестве отрицательного контроля. Через 6 дней отбирали 100 мкл крови ретроорбитальным путем и анализировали на Thy1.1 $^+$ CD8 $^+$ Т-клетки на цитометре BD FACSCanto II («Becton Dickinson GmbH») с применением крысиного анти-мышинного CD45 V500 («Becton Dickinson GmbH», Cat № 561487), FITC-меченые крысиные антитела против CD8a мыши («Life Technologies», кат. MCD0801) и Alexa Fluor 647 антитела против крысиных CD90/мышинных CD90.1 («BioLegend Europe», кат. № 202508). Позитивность по Thy1.1 (CD90,1) применяли в качестве заменителя OT-1-специфических Т-клеток.

Фигура 11 А представляет собой схематическое представление схемы анализа адоптивного переноса Т-клеток OT-1. Фигура 11 В показывает анализ частот Thy1.1 $^+$ CD8 $^+$ Т-клеток, определенных способом проточной цитометрии. Для каждого способа лечения биспецифическим антителом применяли n=5 мышей. Один только антигенный стимул овальбумина приводил к заметному увеличению частоты Thy1.1 $^+$ CD8 $^+$ Т-клеток по сравнению с необработанными животными. Интересно, что оба моновалентных контрольных антитела, имеющие один нерелевантный связывающий фрагмент b12,

mCD137-3H3-xb12 и mPD-L1-MPDL3280Axb12, не были способны стимулировать экспансию специфических для овальбумина Т-клеток OT-1 по сравнению с животными, которых лечили только овальбумином. Напротив, биспецифическое антитело mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A было в состоянии индуцировать сильную пролиферацию Т-клеток OT-1, приводя к частотам Т-клеток, равным 10-20% CD8⁺/OT-1⁺/Thy1.1⁺ Т-клеток (% от общей популяции Т-клеток) при обоих испытанных уровнях дозы (20 и 100 мкг антитела).

Пример 11: Влияние суррогатного биспецифического мышинового антитела, связывающегося с mPD-L1 и mCD137, на рост опухоли в модели подкожной сингенной опухоли мыши CT26

Самок мышей BALB/c Rj («Janvier», Genest-St.-Îsle, Франция) в возрасте 6-8 недель с весом от 17 до 24 г акклиматизировали, по меньшей мере, в течение шести дней до включения в исследование. Мыши имели свободный доступ к еде (ssniff M-Z, автоклавируемый Soest, Германия) и стерильной воде и их содержали в условиях 12-часового цикла свет/темнота при 22°C ± 2°C с относительной влажностью 55% ± 10%. Клетки CT26 были получены из ATCC® (кат. № CRL-2638™), и их культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640, GlutaMAX™ («Life technologies», кат. № 61870-044) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) («Biochrom», кат. № S 0115) в 5% CO₂ при 37°C. Клетки собирали с применением реагента для диссоциации клеток StemPro® Accutase® («Life technologies» кат. № A1110501), ресуспендировали в DPBS («Life technologies», кат. № 14190-169) и 0,5 × 10⁶ клеток/100 мкл на мышью подкожно (SC) имплантировали в правый бритый бок самкам мышей BALB/c Rj. Объем опухоли оценивали по измерениям с помощью штангенциркуля каждые 2-3 дня и выражали как произведение перпендикулярных диаметров по следующей формуле: a2 x b/2, где b – самый длинный из двух диаметров (a<b). Животных разделяли на четыре группы при достижении среднего объема опухоли 30 мм³. Лечение начинали на следующий день с внутрибрюшинной инъекции 20 мкг биспецифического антитела, связывающегося с mPD-L1 и mCD137 (mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A), с моновалентными mCD137- или контрольными mPD-L1 антителами, имеющими один нерелевантный связывающий фрагмент (mCD137-3H3xb12 и mPD-L1-MPDL3280Axb12) или PBS в качестве отрицательного контроля. График дозирования строили каждые 2-3 дня для первых восьми инъекций, с последующими инъекциями каждые 7 дней до конца эксперимента. На 29 день после инокуляции опухолевых клеток отбирали 100 мкл крови ретроорбитальным путем и анализировали на gp70-специфические CD8⁺ Т-клетки (gp70 представляет собой белок оболочки,

экспрессированный на опухолевых клетках CT26) на цитометре BD FACSCanto II («Becton Dickinson GmbH») с применением V500, крысиного антитела против CD45 мыши («Becton Dickinson GmbH», кат. № 561487), FITC-меченого крысиного антитела против CD8 α мыши («Life Technologies», кат. № MCD0801) и тетрамера H-2Ld MuLV gp70 T-Select-SPSYVYHQF-APC (MBL Ltd. Corp., кат. № TS-M521-2).

Фигура 12А показывает кривые роста опухоли для всех четырех групп лечения с отдельными линиями, представляющими одну опухоль/мышь. Частоты выживаемости без прогрессирования (PFS) для соответствующих групп лечения приведены внизу каждого графика. Фигура 12 В отображает соответствующие кривые выживаемости Каплана-Мейера до конца эксперимента на 71 день после инокуляции опухолевых клеток. Фигура 12 С показывает анализ частот тетрамера gp70⁺ CD8⁺ Т-клеток, определенных способом проточной цитометрии. Для каждого способа лечения были проанализированы все мыши, которые были еще живы на 29 день после имплантации опухолевых клеток. Суммируя, биспецифическое антитело, связывающееся с mPD-L1 и mCD137 (mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A), обеспечивало наиболее эффективный контроль опухоли у 5 из 10 (то есть 50%) животных, находящихся в полной регрессии опухоли. Для сравнения, для контроля mCD137-3H3xb12 наблюдался немного более слабый, но все еще выраженный противоопухолевый эффект; лечение привело к тому, что 3 из 11 (т.е. 27%) животных были способны отторгнуть опухоли. В обоих случаях у всех мышей, у которых наступила полная ремиссия, опухоль не возникала до конца эксперимента. В противоположность этому как когорта, обработанная mPD-L1-MPDL3280Axb12, так и контроль PBS не смогли контролировать опухолевую нагрузку, поскольку лечение mPD-L1-MPDL3280Axb12 приводило, по крайней мере, к некоторому прерывистому ингибированию роста опухоли у 2 из 11 (т.е. 18%) животных между 15 и 30 днем после инокуляции опухолевых клеток. При изучении частоты CD8⁺ Т-клеток, которые были способны связывать тетрамеры gp70, наивысшие частоты специфичных к gp70 Т-клеток CD8⁺ были обнаружены у животных, получавших mCD137-3H3xmPD-L1-MPDL3280A (2,14% \pm 1,52%). Для сравнения: частота тетрамера gp70 + CD8 Т-клеток у mCD137-3H3xb12 (0,90% \pm 0,46%), mPD-L1-MPDL3280Axb12 (0,94% \pm 1,06%) и у контрольных животных, получавших PBS (0,66% \pm 0,49%), были значительно ниже только с минимальными различиями между этими тремя способами лечения.

Пример 12: Связывание антител PD-L1 или биспецифических антител b12xPD-L1 с опухолевыми клетками

Связывание антител PD-L1 и биспецифических антител b12xPD-L1 с опухолевыми клеточными линиям человека MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы; ATCC;

кат. № НТВ-26), РС-3 (аденокарцинома простаты; АТСС; кат. №. CRL-1435) и SK-MES-1 (плоскоклеточный рак легких; АТСС; кат. № НТВ-58) анализировали проточной цитометрией.

Клетки ($3-5 \times 10^4$ клеток/лунку) инкубировали в полистирольных 96-луночных круглодонных планшетах («Greiner bio-one», кат. № 650101) с серийными разведениями антител (в диапазоне от 0,0001 до 10 мкг/мл в 5-кратных стадиях разведения) в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер FACS) при 4°C в течение 30 минут. После промывки дважды в буфере FACS клетки инкубировали со вторичным антителом при 4°C в течение 30 минут. В качестве вторичного антитела для всех экспериментов применяли конъюгированные с R-фикоэритрином (PE) козы антигена против человеческого IgG F(ab')₂ (кат. № 109-116-098, «Jackson ImmunoResearch Laboratories», Inc., West Grove, PA), разведенного 1:500 в 50 мкл буфера FACS. Затем клетки дважды промывали в буфере FACS, ресуспендировали в 20 мкл буфера FACS и анализировали на скринере iQue («Intellicyt Corporation», США). Кривые связывания анализировали с применением нелинейной регрессии (сигмоидальный доза-ответ с переменным наклоном) с применением программного обеспечения GraphPad Prism V75,04 («GraphPad Software», Сан-Диего, Калифорния, США).

Количественную проточную цитометрию (QIFIKIT®, Dako; кат. № K0078) выполняли, как описано (Poncelet and Carayon, 1985, J. Immunol. Meth. 85: 65-74), применяя MPDL3280A (вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепи, указанные в SEQ. ID NO: 57 и 58, соответственно), для количественной оценки плотности антигена на плазматической мембране клеток MDA-MB-231, РС-3 и SK-MES-1. Было определено, что клеточные линии имеют следующую плотность антигена PD-L1 (ABC, способность связывания антител):

- MDA-MB-231: приблизительно 21000 ABC/клетку
- РС-3: приблизительно 6000 ABC/клетку
- SK-MES-1: приблизительно 30000 ABC/клетку

Связывание с клетками MDA-MB-231

Фигура 13 (А) показывает дозозависимое связывание b12-FEALxPD-L1-547-FEAR с клетками MDA-MB-231 с более высоким максимальным связыванием, чем у моноспецифического, двухвалентного PD-L1-547-FEAR.

Связывание с клетками РС-3

Фигура 13 (В) показывает дозозависимое связывание b12-FEALxPD-L1-547-FEAR с клетками РС3 с более высоким максимальным связыванием, чем у моноспецифического,

двухвалентного PD-L1-547-FEAR.

Связывание с клетками SK-MES-1

Фигура 13 (С) показывает дозозависимое связывание b12-FEALxPD-L1-547-FEAR с клетками SK-MES-1 с более высоким максимальным связыванием, чем у моноспецифического, двухвалентного PD-L1-547-FEAR.

Пример 13. Определение вклада аминокислотных остатков CD137 в связывание антител с помощью аланинового сканирования

Дизайн библиотеки

Синтезировали библиотеку CD137 с единственным остатком аланина (Uniprot Q07011) (Geneart), в которой все аминокислотные остатки во внеклеточном домене человеческого CD137 были индивидуально мутированы в аланины, за исключением положений, уже содержащих аланины или цистеины. Чтобы свести к минимуму вероятность структурного разрушения антигена, цистеины не были мутированы. Позиции с аланинами были мутированы в глицины. Библиотека была клонирована в вектор экспрессии pMAC, содержащий каскету экспрессии CMV/TK-polyA, ген устойчивости к Amp и источник репликации pBR322.

Получение библиотеки и скрининг

CD137 дикого типа и мутанты с аланином экспрессировали индивидуально в клетках FreeStyle HEK293 в соответствии с инструкциями производителя («Thermo Scientific»). Через один день после трансфекции клетки собирали. Приблизительно 100000 клеток инкубировали с 20 мкл интересующего конъюгированного с Alexa Fluor® 488 (A488) антитела в буфере FACS (таблица 3). Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем клетки дважды промывали центрифугированием, применяя 150-200 мкл буфера FACS. Клетки суспендировали в 30 мкл буфера FACS и хранили при 4°C до анализа с помощью проточной цитометрии с применением приспособления для скрининга iQue.

Весь эксперимент был выполнен в трех повторах.

Таблица 3: Антитела, примененные при определении вклада аминокислотных остатков CD137 в связывание антител с помощью сканирования аланином. Перед проведением эксперимента антитела были помечены Alexa488 («Invitrogen», номер по каталогу A20000) в соответствии с инструкциями производителя. CD137-MOR7480-FEAR представляет собой суррогатное антитело MOR7480, которое было клонировано в основную цепь IgG1 человека, содержащую мутации FEAR.

Антитело	Конечная концентрация	Конъюгат
b12-FEALxCD137-009-FEAR-A488	3 мкг/мл	Alexa488
CD137-005-FEAR-A488		
CD137-MOR7480-FEAR-A488		

Анализ данных

Для каждого образца среднее количество антител, связавшихся с клеткой, определяли как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции отдельных клеток. На gMFI влияет сродство антитела к мутанту CD137 и уровень экспрессии мутанта CD137 на клетку. Поскольку специфические мутации аланина могут влиять на уровень поверхностной экспрессии мутанта CD137 и корректировать различия в экспрессии для каждого мутанта CD137 в целом, данные были нормализованы относительно интенсивности связывания специфического контрольного антитела, не блокирующего CD137, с помощью следующего уравнения:

$$\text{Нормализованный } gMFI_{\text{положение aa}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{тестируемое Ab}}}{gMFI_{\text{контрольное Ab}}} \right)$$

В котором «положение aa» относится к положению, которое было мутировано в аланин или глицин. Чтобы выразить потерю или усиление связывания антител, z-оценку рассчитывали согласно следующему расчету:

$$z - \text{оценка (кратность изменения)} = \frac{\text{Нормализованный } gMFI_{\text{aa position}} - \mu}{\sigma}$$

В котором μ и σ представляют собой среднее и стандартное отклонение нормализованной gMFI, рассчитанной для всех мутантов.

Z-оценка, равная 0, указывает на отсутствие потери или усиления связывания с конкретным антителом по сравнению с связыванием эталонного антитела; z-оценка > 0 указывает на усиление связывания по сравнению с связыванием эталонного антитела; z-оценка < 0 указывает на потерю связывания по сравнению с связыванием эталонного антитела. В большинстве случаев усиление связывания, определяемое по z-оценке, обусловлено потерей связывания эталонного антитела со специфическими аланиновыми или глициновыми мутантами. Чтобы исправить вариабельность образца, только «аминокислотные остатки CD137, у которых z-оценка в связывании была ниже -1,5, считали потерей связывающих мутантов».

Если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта CD137 была ниже, чем средняя $gMFI_{\text{положение aa}} - 2,5 \times SD$ средней $gMFI_{\text{контрольное Ab}}$, то данные исключали из анализа (предполагается, что уровни экспрессии для этих мутантов CD137 были

недостаточными для получения вывода).

Фигура 14 показывает потерю связывания антител к CD137 с вариантами CD137 с аланиновыми или глициновыми мутациями в положениях с 1 по 163 (согласно SEQ ID 41). Результаты показывают, что

- антитело CD137-005-FEAR показывает потерю связывания, если aa L1, Q2, P4, G11, T12, D15 или Q20 были мутированы в аланин. Это говорит о том, что связывание антитела с CD137-005-FEAR зависит, по меньшей мере, от aa L1, Q2, P4, G11, T12, D15, Q20 человеческого CD137,
- антитело b12-FEALxCD137-009-FEAR показывает потерю связывания, если aa F13, F30, T38, D40 или N60 были мутированы в аланин. Это говорит о том, что связывание антитела b12-FEALxCD137-009-FEAR зависит, по меньшей мере, от aa F13, F30, T38, D40 и N60 человеческого CD137. Поскольку F13 и F30, скорее всего, структурно влияют на взаимодействие эпитопа, то антитело b12-FEALxCD137-009-FEAR зависит, по крайней мере, от aa T38, D40 и N60,
- антитело CD137-MOR7048-FEAR показало потерю связывания, когда L72, G93, F102, N103, I109, R111 или W113 были мутированы в аланин. Это говорит о том, что связывание антитела MOR7048, по меньшей мере, зависит от aa L72, G93, F102, N103, I109, R111 и W113 человеческого CD137.

Пример 14: Неантигенспецифический анализ пролиферации Т-клеток для измерения эффектов связывания биспецифических антител с PD-L1 и CD137

Схематическое изображение ожидаемого способа действия биспецифических антител PD-L1xCD137 показано на фигуре 6.

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток в поликлонально активированные Т-клетки PBMC инкубировали с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 (клон UCNT1), для активирования Т-клеток, в комбинации с PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR биспецифическим антителом или контрольными антителами. В популяции клетки PBMC, экспрессирующие PD-L1, могут быть связаны PD-L1-специфическим фрагментом биспецифического антитела, тогда как Т-клетки в популяции могут быть связаны специфическим для CD137-специфическим фрагментом. В этом анализе пролиферация Т-клеток представляла собой меру трансактивации Т-клеток через CD137-специфический фрагмент, индуцированную сшивкой с PD-L1-экспрессирующими клетками через биспецифическое антитело и путем блокады взаимодействие PD-L1:PD-1, измеряли как пролиферацию Т-клеток.

PBMC получали из лейкоцитарной пленки здоровых доноров (Transfusionszentrale, Университетская клиника, Майнц, Германия) с применением градиента фиколла (VWR,

кат. № 17-5446-02). PBMC метили с помощью 1,6 мкМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) («Thermo Fisher», кат. № C34564) в PBS в соответствии с инструкциями производителя. 75000 меченных CFSE PBMC высевали на лунку в 96-луночный круглодонный планшет («Sigma Aldrich», CLS3799-50EA) и инкубировали с субоптимальной концентрацией антител против CD3 («R&D Systems», клон UCNT1, кат. № MAV100; конечная концентрация 0,03-0,1 мкг/мл), которая был предварительно определена для каждого донора для индукции неоптимальной пролиферации Т-клеток и биспецифических или контрольных антител, в 150 мкл IMDM GlutaMAX с добавлением 5% сыворотки АВ человека, при 37°C, 5% CO₂, в течение четырех дней. Пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток анализировали проточной цитометрией, по существу, как описано выше. 30 мкл, содержащие PE4-меченное антитело против CD4 («BD Biosciences», кат. № 555347; конечное разведение 1:80), PE-Cy7-меченное антитело против CD8α (клон RPA-T8, «eBioscience», кат. № 25-0088-41; окончательное разведение 1:80), меченное APC антитело против CD56 («Biosciences», кат. № 17-0567; конечное разведение 1:80) и 7-AAD («Beckman Coulter», кат. № A07704; конечное разведение 1:80) в буфере FACS применяли для окрашивания клеток и исключения из анализа естественных киллеров (NK) CD56⁺ клеток и 7-AAD⁺ мертвых клеток. Образцы измеряли на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences) в качестве показаний пролиферации. Детальный анализ пролиферации Т-клеток на основе пиков CFSE, указывающих на деление клеток, был выполнен с помощью программного обеспечения FlowJo 10.4, а экспортированные значения индекса экспансии были использованы для построения кривых доза-ответ в версии 6.04 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). Индекс экспансии определяет кратность экспансии общей культуры; индекс экспансии, равный 2,0, представляет собой удвоение количества клеток, тогда как индекс экспансии, равный 1,0, отражает отсутствие изменения в общем количестве клеток.

PBMC от трех разных доноров анализировали, тестируя две разные концентрации анти-CD3 для стимуляции и в качестве контроля без анти-CD3. Фигура 15 показывает, что биспецифическое антитело PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR вызывало сильную экспансию как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток. Моновалентное CD137-контрольное антитело, b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, имевшее один нерелевантный фрагмент и соответствующее двухвалентное родительское антитело CD137-009-NC7LC2-FEAR, не влияло на пролиферацию Т-клеток CD4⁺ (А) или CD8⁺ (В) по сравнению с инкубацией с изотипическим контрольным антителом b12 IgG. Моновалентное PD-L1-контрольное антитело, а также двухвалентное родительское антитело (b12-FEALxPD-L1-547-FEAR и PD-L1-547-FEAR, соответственно) незначительно увеличивали пролиферацию Т-клеток

по сравнению с b12 IgG, только когда стимуляция РВМС анти-CD3 уже приводила к сильной активации Т-клеток (что наблюдали по более высокому индексу экспансии в контрольной группе только со средой [см. донор 1 при стимуляции 0,1 мкг/мл анти-CD3]). Уровень пролиферации Т-клеток, сравнимый с моновалентными и двухвалентными контрольными антителами PD-L1, был также обнаружен для комбинированных моновалентных контрольных антител (b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR + b12-FEALxPD-L1-547-FEAR) и комбинированных соответствующих родительских антител (CD137-009-NC7LC2-FEAR + PD-L1-547-FEAR). Однако усиление пролиферации, вызванное биспецифическим антителом PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, превосходило оба комбинированных контроля (одновалентный и двухвалентный) (фигура 15).

В другом независимом исследовании значения EC₅₀ для PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR определяли с применением РВМС, полученных от двух доноров, которые были субоптимально стимулированы 0,03 и 0,09 мкг/мл анти-CD3. PD-L1-547-FEAL xCD137-009-NC7LC2-FEAR анализировали с применением серийных разведений, начиная с 1 мкг/мл и заканчивая 0,15 нг/мл, и b12-IgG-FEAL в концентрации 1 мкг/мл был включен в качестве антитела изотипического контроля. Для пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток были построены кривые доза-ответ (фигура 16), а для пролиферации CD8⁺ Т-клеток также были определены значения EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀, как показано в таблице 4.

Таблица 4. Определение значений EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀ для PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR на основе данных экспансии CD8⁺ Т-клеток, полученных неантигенспецифическим анализом пролиферации Т-клеток. Приведенные данные представляют собой значения, рассчитанные на основе четырехпараметрического логарифмического соответствия (фигура 16).

Донор	анти-CD3 [мкг/мл]	Значение EC ₅₀ [мкг/мл]	Коэффициент Хилла	Рассчит. EC ₂₀ [мкг/мл]	Рассчит. EC ₉₀ [мкг/мл]
1	0,03	0,01218	1.134	0,00359	0,08455
2	0,09	0,00689	0,635	0,00078	0,21917

Пример 15: Анализ антигенспецифической пролиферации Т-клеток CD8⁺ для измерения высвобождения цитокинов, вызванного связыванием биспецифических антител с PD-L1 и CD137

Индукцию высвобождения цитокинов биспецифическим антителом PD-L1-547-

FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, направленным на PD-L1 и CD137, измеряли в антиген-специфическом анализе, который в основном выполняли, как описано в примере 7.

Т-клетки подвергали электропорации с 10 мкг α -цепи TCR и 10 мкг РНК, кодирующей β -цепь, с 2 мкг PD-1-кодирующей IVT РНК или без нее. Электропорированные Т-клетки не метили CFSE (как описано выше), а переносили в свежую среду IMDM («Life technologies GmbH», кат. № 12440-061) с добавлением 5% сыворотки АВ человека сразу после электропорации. iDC электропорировали с помощью 5 мкг кодирующей клаудин-6 (CLDN6) РНК, как описано выше. После O/N инкубации DC окрашивали конъюгированным с Alexa647 CLDN6-специфическим антителом и Т-клетками с антителом против β -цепи TCR мыши и антителом против человеческого CD279, как описано выше.

5000 электропорированных DC инкубировали с 50000 электропорированными Т-клетками в присутствии различных концентраций биспецифического антитела PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR или контрольного антитела b12xIgG-FEAL в IMDM GlutaMAX с добавлением 5% человеческой сыворотки АВ в 96-луночном круглодонном планшете. После 48-часового периода инкубации планшеты центрифугировали при $500 \times g$ в течение 5 минут, и супернатант осторожно переносили из каждой лунки в свежий 96-луночный круглодонный планшет и хранили при 80°C до проведения анализа на цитокины на платформе MSD®. Собранные супернатанты из анализа антигенспецифической пролиферации анализировали на уровни цитокинов для 10 различных цитокинов с помощью набора MSD V-Plex Human Proinflammatory panel 1 (10-Plex) («Meso Scale Diagnostics», LLC., кат. № K15049D-2) на приборе MESO QuickPlex SQ 120 («Meso Scale Diagnostics», LLC., кат. № R31QQ-3) в соответствии с инструкциями производителя.

Добавление PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR приводило к зависимому от концентрации увеличению секреции, прежде всего IFN- γ , TNF- α , IL-13 и IL-8 (фигура 17). Уровни всех других цитокинов (IL-10, IL-12p70, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6) были не выше, чем уровни, обнаруженные для совместных культур, обработанных контрольным антителом b12-IgG- FEAL. При сравнении совместного культивирования Т-клеток:DC, где Т-клетки не подвергали электропорации с РНК PD-1, с теми, где Т-клетки электропорировали с 2 мкг РНК PD-1, несколько более высокие уровни цитокинов были обнаружены для совместного культивирования без электропорации РНК PD-1. Это наблюдали как для кривой доза-ответ PD-L1-547-FEALxCD137-009-FEAR, так и для контрольных значений антител b12-IgG-FEAL.

Пример 16: Антиген-неспецифический анализ пролиферации Т-клеток *in vitro*

для измерения высвобождения цитокинов, индуцированного биспецифическими антителами, связывающимися с PD-L1 и CD137

Индукцию высвобождения цитокинов с помощью биспецифического антитела PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, нацеленного на PD-L1 и CD137, измеряли в неспецифическом по антигену анализе пролиферации Т-клеток *in vitro*, проведенном по существу, как описано выше (пример 14). Влияние транс-связывания, то есть одновременного связывания обоих фрагментов с соответствующими мишенями, на высвобождение десяти провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-13, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-1 (IL-2, IL-2, IL-4, IL-6) анализировали с помощью мультиплексного сэндвич-иммуноанализа супернатантов, собранных через 48 часов после добавления антител.

РВМС не метили CSFE (как описано выше), а высевали сразу после выделения и применяли только одну концентрацию антитела против CD3 (конечная концентрация 0,03 мкг/мл).

После 48-часового периода инкубации клетки собирали центрифугированием при 500 g в течение 5 минут, и супернатант осторожно переносили из каждой лунки в свежий 96-луночный круглодонный планшет и хранили при -80°C до выполнения анализа цитокинов на платформе MSD[®]. Собранные супернатанты анализировали на уровни цитокинов для 10 различных цитокинов с помощью набора MSD V-Plex Human Proinflammatory panel 1 (Человеческая провоспалительная панель 1 MSD V-Plex) (10-Plex) («Meso Scale Diagnostics», LLC., кат. № K15049D-2) на приборе MESO QuickPlex SQ 120 («Meso Scale Diagnostics», LLC., кат. № R31QQ-3) в соответствии с инструкциями производителя.

Добавление PD-L1-547-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR вызывало зависимое от концентрации увеличение секреции, прежде всего IFN- γ , TNF- α , IL-2 и IL-13 (фигура 18). Кривая доза-ответ с незначительно повышенными уровнями также была обнаружена для IL-10, IL-12p70, а также для IL-4. Цитокины IL-1 β , IL-6 и IL-8 оставались на базовых уровнях и, следовательно, были сопоставимы с уровнями, обнаруженными для совместных культур, обработанных контрольным антителом b12-IgG-FEAL.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий агент, включающий первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором вторая антигенсвязывающая область ингибирует связывание человеческого PD-L1 с человеческим PD-1.

2. Связывающий агент по п. 1, в котором вторая антигенсвязывающая область связывается с PD-L1 яванского макака (*Macaca fascicularis*), приведенном в SEQ ID NO: 29, или с его зрелым полипептидом.

3. Связывающий агент по любому из п.п. 1-2, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание PD-L1 человека с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20 и

b. переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот модифицировано в SEQ ID NO: 23.

4. Связывающий агент по любому из п.п. 1-3, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью в отношении PD-L1 антитела, включающего:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20 и

b. переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот модифицировано в SEQ ID NO: 23.

5. Связывающий агент по любому из п.п. 1-4, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 20.

6. Связывающий агент по любому из п.п. 1-5, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 19.

7. Связывающий агент по любому из п.п. 1-6, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18, или последовательность, в которой вплоть до одной аминокислоты модифицировано в SEQ ID NO: 18.

8. Связывающий агент по любому из п.п. 1-7, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которой последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно.

9. Связывающий агент по любому из п.п. 1-8, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

10. Связывающий агент по любому из п.п. 1-9, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в котором последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 22, DDN, 23, соответственно.

11. Связывающий агент по любому из п.п. 1-10, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей

мере, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 17.

12. Связывающий агент по любому из п.п. 1-11, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17.

13. Связывающий агент по любому из п.п. 1-12, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 21.

14. Связывающий агент по любому из п.п. 1-13, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 21.

15. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17, и VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 21.

16. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область связывается с CD137 яванского макака (*Macaca fascicularis*), как указано в SEQ ID NO: 31, или с его зрелым полипептидом.

17. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, как указано в SEQ ID NO: 30 или с его зрелым полипептидом в большей степени, чем она связывается с мутантным CD137 человека, как указано в SEQ ID NO: 33, или с его зрелым полипептидом.

18. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область связывается с мутантным CD137 человека, как указано в

SEQ ID NO:34, или с его зрелым полипептидом в той же степени, как она связывается с CD137 человека, как указано в SEQ IDNO: 30, или с его зрелым полипептидом.

19. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое конкурирует за связывание CD137 человека с антителом, включающим:

a. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 11 и

переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 14; или

b. переменную область тяжелой цепи, включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 52 и

переменную область легкой цепи, включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (LCDR3), имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 55.

20. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, связывается, по меньшей мере, с одной аминокислотой в аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO:40.

21. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека:

a. связывается с тем же эпитопом CD137 человека, что и антитело, включающее последовательность VH, как указано в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, как указано в SEQ ID NO: 16; или

b. связывается с тем же эпитопом CD137 человека, что и антитело, включающее последовательность VH, как указано в SEQ ID NO: 49, и последовательность VL, как указано в SEQ ID NO: 53.

22. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью в отношении CD137 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 11 и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, или последовательность, в которой вплоть до четырех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 14; или

b. переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое обладает специфичностью в отношении CD137 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи, включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 52, и переменную область легкой цепи, включающую LCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 55, или последовательность вплоть до четырех аминокислот, модифицированы в SEQ ID NO: 55.

23. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 11; или

b. переменную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR3, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность вплоть до трех аминокислоты модифицированы в SEQ ID NO: 52.

24. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую:

a. HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, в которой вплоть до двух аминокислот модифицировано в SEQ ID NO: 10;

b. HCDR2, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO: 52.

25. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO:9; или

b. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую HCDR1, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, или последовательность, в которой вплоть до трех аминокислот модифицированы в SEQ ID NO:50.

26. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которой последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, 10, 11, соответственно; или

b. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, в которой последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно.

27. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которой последовательность LCDR1, LCDR2 и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно; или

b. вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2, и LCDR3, в которой последовательность LCDR1, LCDR2, и LCDR3 включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS, 55, соответственно.

28. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2, и LCDR3, в которой

последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 9, 10, 11, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно; или

b. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность LCDR1, LCDR2, и LCDR3, в которой последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 50, 51 и 52, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2, и LCDR3 представляют собой последовательности, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS, 55, соответственно.

29. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 15; или

b. вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VH, как указано в SEQ ID NO: 49.

30. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15; или

b. вариабельную область тяжелой цепи (VH), в которой VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 49.

31. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. варибельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 16; или

b. варибельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью последовательности VL, как указано в SEQ ID NO: 53.

32. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. варибельную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16; или

b. варибельную область легкой цепи (VL), в которой VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53.

33. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137 человека, включает:

a. варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), в которой последовательность VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15, и последовательность VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16; или

b. варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), в которой последовательность VH включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 49, и последовательность VL включает последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53.

34. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, включающий первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO:9, 10, 11, соответственно, или переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO:50, 51, 52, соответственно; и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно.

35. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, включающий первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO:9, 10, 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO: 13, GAS, 14, соответственно, или

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, как указано в SEQ ID NO:50, 51 и 52, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, как указано в SEQ ID NO: 54, SAS и 55, соответственно;

и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO: 18, 19, 20, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, как указано в SEQ ID NO:22, DDN, 23, соответственно.

36. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, включающий первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности, как указано в SEQ ID NO: 15, или

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:49;

и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17.

37. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, включающий первую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим CD137, и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с человеческим PD-L1, в котором

a. первая антигенсвязывающая область включает

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 16, или

- переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:49, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 53;

и

b. вторая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательность, как указано в SEQ ID NO:21.

38. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент представляет собой мультиспецифическое антитело.

39. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент находится в формате полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

40. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область включает первую переменную область тяжелой цепи (VH) и первую переменную область легкой цепи (VL) и указанная вторая антигенсвязывающая область включает вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и вторую переменную область легкой цепи (VL).

41. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором каждая переменная область включает три определяющие комплементарности области (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

42. Связывающий агент по п. 41, в котором указанные определяющие комплементарность области и указанные каркасные области расположены от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

43. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, который включает (i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и дополнительно включающий первую константную область тяжелой цепи (CH), и (ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и дополнительно включающий вторую константную область тяжелой цепи (CH).

44. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, который включает (i) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий первую константную область легкой цепи (CL), и (ii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и дополнительно включающий вторую константную область легкой цепи (CL).

45. Связывающий агент по п.п. 43-44, который представляет собой антитело, включающее первый связывающий фрагмент и второй связывающий фрагмент, в котором

a. первый связывающий фрагмент включает i) полипептид, включающий указанную первую переменную область тяжелой цепи (VH) и указанную первую константную область тяжелой цепи (CH) и ii) полипептид, включающий указанную первую переменную область легкой цепи (VL) и указанную первую константную область легкой цепи (CL), и;

b. второй связывающий фрагмент включает iii) полипептид, включающий указанную вторую переменную область тяжелой цепи (VH) и указанную вторую константную область тяжелой цепи (CH), и iv) полипептид, включающий указанную вторую переменную область легкой цепи (VL) и указанную вторую константную область легкой цепи (CL).

46. Связывающий агент по любому из п.п. 43-45, в котором каждая первая и вторая константная область тяжелой цепи (CH) включает одно или несколько из: область домена константной области 1 (область CH1), шарнирная область, область CH2 и область CH3, предпочтительно, по меньшей мере, из шарнирной области, области CH2 и области CH3.

47. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент имеет изотип, выбранный из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

48. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

49. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором
- a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137, получена из химерного антитела, и/или
 - b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из химерного антитела.
50. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором
- a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с CD137, получена из гуманизированного антитела, и/или
 - b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из гуманизированного антитела.
51. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором
- a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, получена из человеческого антитела, и/или
 - b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из человеческого антитела.
52. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором
- a. первая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим CD137, получена из гуманизированного антитела, и/или
 - b. вторая антигенсвязывающая область, связывающаяся с человеческим PD-L1, получена из человеческого антитела.
53. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором каждая первая и вторая константная область тяжелой цепи (CH) включает области CH3 и в котором две области CH3 включают асимметричные мутации.
54. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором в указанной первой константной области тяжелой цепи (CH) заменена, по меньшей мере, одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, и в указанной второй константной области тяжелой цепи (CH) заменена, по меньшей мере, одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, и в котором указанные первая и вторая тяжелая цепи не имеют замен в одинаковых положениях.
55. Связывающий агент по п. 54, в котором (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной первой константной области тяжелой цепи (CH), и

аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной второй константной области тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, согласно нумерации EU, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, согласно нумерации EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

56. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором указанное антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с другим антителом, включающим одну и ту же первую и вторую антигенсвязывающую области и две константные области тяжелой цепи (CH), включающие шарнирную области, области CH2 и CH3 человеческого IgG1.

57. Связывающий агент по п. 56, в котором указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи (CH) модифицированы так, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое идентично за исключением того, что включает немодифицированные первую и вторую константные области тяжелой цепи (CH).

58. Связывающий агент по любому из п.п. 56-57, в котором указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют по связыванию с рецепторами Fc γ , связыванию с C1q или по индукции Fc-опосредованного сшивания рецепторов Fc γ .

59. Связывающий агент по п. 58, в котором указанную Fc-опосредованную эффекторную функцию измеряют по связыванию с C1q.

60. Связывающий агент по п. 53, в котором указанные первая и вторая константные области тяжелой цепи изменены так, чтобы связывание C1q с указанным антителом снижается по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно, снижается на, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или 100%, в котором связывание C1q предпочтительно определяют с помощью ELISA.

61. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором, по меньшей мере, в одной из указанных первой и второй константной области тяжелой цепи (CH) одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно.

62. Связывающий агент по п. 61, в котором положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

63. Связывающий агент по п. 61, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, представляют собой F, E и A, соответственно, в указанных первой и второй константных областях тяжелой цепи (HC).

64. Связывающий агент по п. 63, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F, E и A, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй константной области тяжелой цепи, представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU, второй тяжелой цепи представляет собой L.

65. Связывающий агент по п. 62, в котором положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU как первой, так и второй константных областей тяжелой цепи, представляют собой F и E, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU первой константной области тяжелой цепи, представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно нумерации EU второй тяжелой цепи, представляет собой L.

66. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент представляет собой мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

67. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент индуцирует и/или усиливает пролиферацию T-клеток.

68. Связывающий агент по п. 67, в котором указанные Т-клетки представляют собой CD4+ и/или CD8+ Т-клетки.

69. Связывающий агент по любому из предыдущих пунктов, в котором связывающий агент активирует сигнализацию CD137 только тогда, когда вторая антигенсвязывающая область связывается с PD-L1.

70. Связывающий агент по п.п. 67-68, в котором пролиферацию Т-клеток измеряют путем совместного культивирования Т-клеток, экспрессирующих специфический рецептор Т-клеток (TCR), с дендритными клетками (DC), презентирующими соответствующий антиген в главном комплексе гистосовместимости, который распознается TCR.

71. Нуклеиновая кислота, кодирующая связывающий агент по любому из п.п. 1-70 или ее полипептидная цепь.

72. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п. 71.

73. Клетка, включающая нуклеиновую кислоту по п. 71 или вектор экспрессии по п. 72.

74. Клетка по п. 73, в которой указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетку яичника китайского хомячка.

75. Композиция, включающая связывающий агент по любому из п.п. 1-70, нуклеиновую кислоту по п. 71, вектор экспрессии по п. 72 или клетку по п. 73 или 74.

76. Композиция по п. 75, которая представляет собой фармацевтическую композицию.

77. Композиция по п. 76, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

78. Связывающий агент по любому из п.п. 1-70, нуклеиновая кислота по п. 71, вектор экспрессии по п. 72, клетка по п. 73 или 74, или композиция по любому из п.п. 75-77 для применения в качестве лекарственного средства.

79. Связывающий агент, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка или композиция по п. 78 для применения в лечении рака.

80. Способ лечения заболевания, включающий введение связывающего агента по любому из п.п. 1-70, нуклеиновой кислоты по п. 71, вектора экспрессии по п. 72, клетки по п.73 или 74 или композиции по любому из п.п. 75-77 нуждающемуся в этом субъекту.

81. Способ по п. 80, в котором заболевание представляет собой рак.

82. Связывающий агент, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка или композиция для применения по п. 79 или способ по п. 81, в котором рак характеризуется

наличием солидных опухолей или в котором рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

83. Связывающий агент, нуклеиновая кислота, вектор экспрессии, клетка или композиция для применения по п. 82 или способ по п. 81, в котором рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

84. Применение связывающего агента по любому из п.п. 1-70, нуклеиновой кислоты по п. 71, вектора экспрессии по п. 72, клетки по п. 73 или 74 или композиции по любому из п.п. 75-77 для производства лекарственного средства, такого как лекарственное средство для лечения рака, например, рака, характеризующегося наличием солидных опухолей, или рака, который выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

85. Применение по п. 84, в котором рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

86. Способ по любому из п.п. 80-81 или применение по п. 84, в котором способ или применение включает комбинацию с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтическое средство.

87. Способ получения биспецифического антитела по п. 66, включающий следующие стадии:

a. культивирование клетки-хозяина, продуцирующей первое антитело, включающее антигенсвязывающую область, связывающуюся с CD137 человека, как определено по любому из п.п. 1 и 16-36, и необязательная очистка указанного первого антитела из культуры;

b. культивирование клетки-хозяина, продуцирующей второе антитело, включающее антигенсвязывающую область, связывающуюся с PD-L1 человека, как определено по любому из пунктов 1-15 и 49-52, и необязательная очистка указанного второго антитела из культуры;

c. инкубирование указанного первого антитела совместно с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области претерпевали изомеризацию дисульфидной связи, и

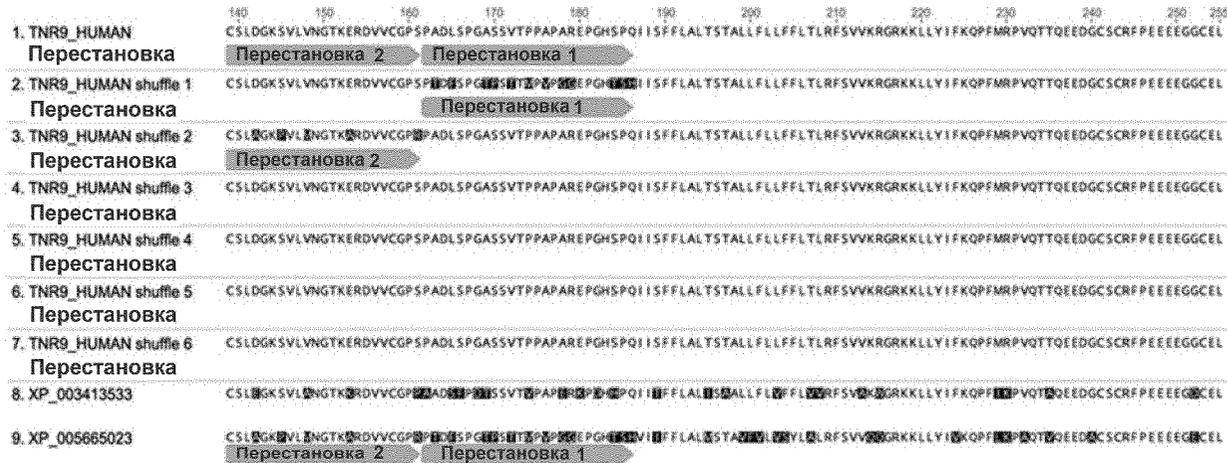
d. получение указанного биспецифического антитела CD137хPD-L1.

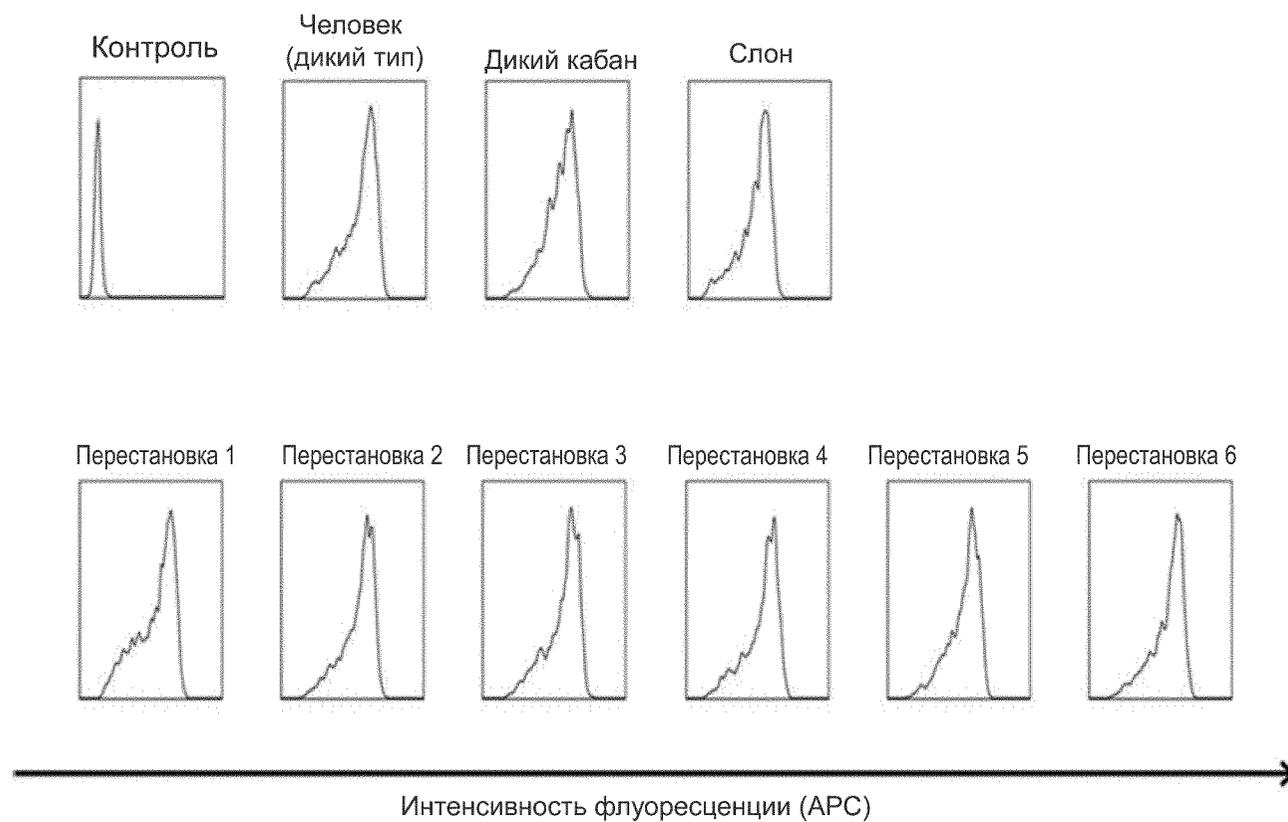
88. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с первой и/или второй антигенсвязывающей областью, как определено в любом из п.п. 1-70.

Фиг. 1

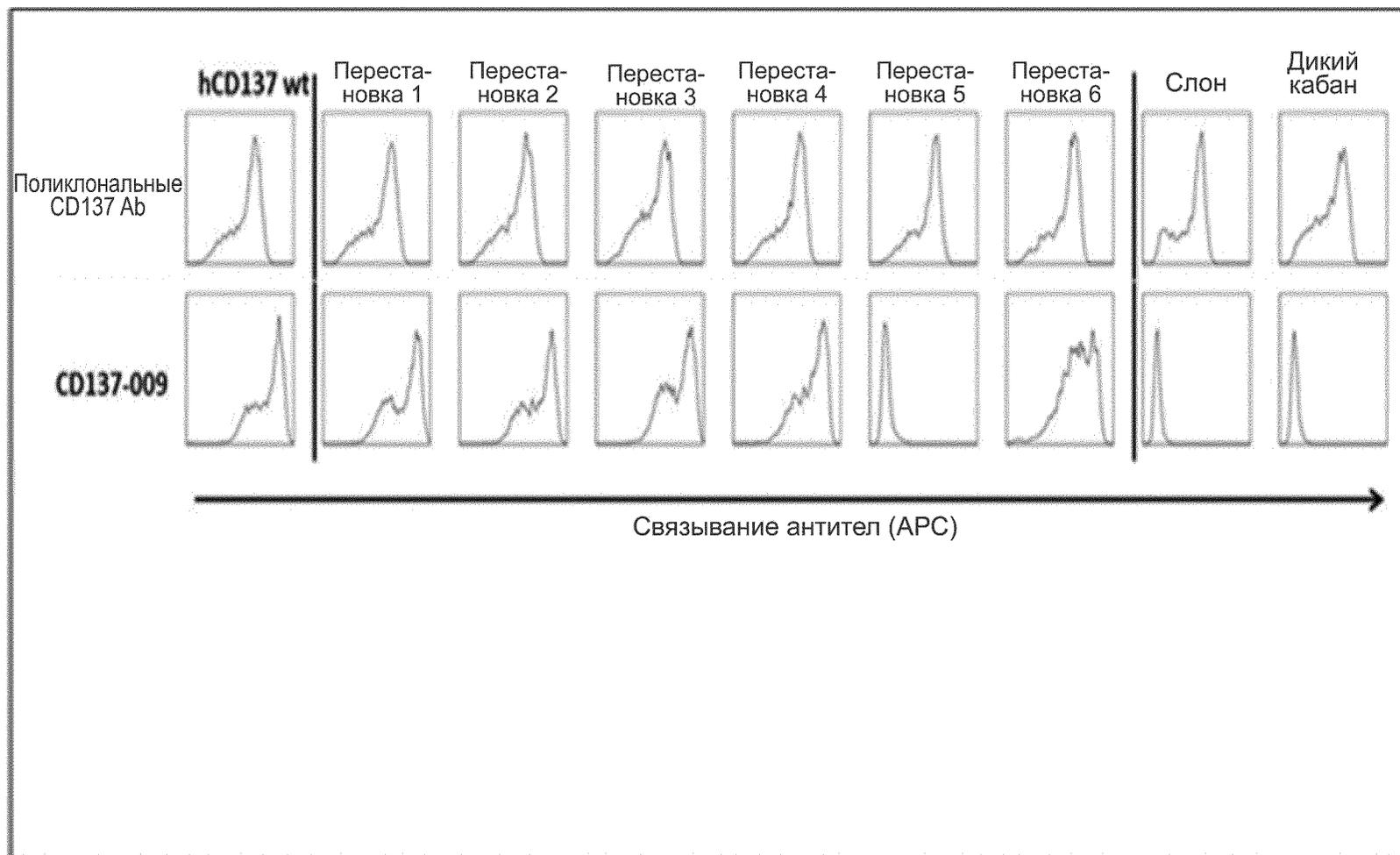
	1	50
Человек (TNR9_HUMAN)	(1) -----MGNSCYNIVATLLLVLNLFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC	
Слон (XP_003413533)	(1) MQDFIMGNQYYNIVATVLLVMNFERTGAVQDSCRDCLAGTYCVKNESQIC	
Кабан (XP_005665023)	(1) MQDFIMGNQYYNIVATVLLVMNFERTRSVPDPCSNCSAGTFCGKNIQELC	
	51	100
Человек (TNR9_HUMAN)	(46) SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL	
Слон (XP_003413533)	(51) SPCPLNSFSSITGGQMNCDMCRKCEGVFKTKRACSETRDAECECVSGFHCL	
Кабан (XP_005665023)	(51) MPCPSNSFSSITSGQKACNVCRKCEGVFRTKKECSSTSNAVCECVPGFRCL	
	101	150
Человек (TNR9_HUMAN)	(96) GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKS	
Слон (XP_003413533)	(101) GAGCTMCOQDCKQGQELTKKGCKDCCIGTFNDQKNGICRPWTNCSLEGKS	
Кабан (XP_005665023)	(101) GAGCAMEEYCOQGQELTQEGCKDCSFGTFNDEEHGVCRPWTD CSLAGKP	
	151	200
Человек (TNR9_HUMAN)	(146) VLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALT	
Слон (XP_003413533)	(151) VLVANGTKKRDVVCGRPAAADSEFDTSSVTVPAPERKPDHHPQIITFFLALI	
Кабан (XP_005665023)	(151) VLMNGTKARDVVCGRPDTDFSPGTPSTTMPVPCGEPGHTSHVITFFLALM	
	201	250
Человек (TNR9_HUMAN)	(196) STALLFLLFFLTLRFVSVVGRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF	
Слон (XP_003413533)	(201) SALLFLVFFLVVRFVAKWGRKLLYIFKQPFVQTAQEEDGCSCRF	
Кабан (XP_005665023)	(201) STAVEVLVSYLALRFVVCGRKLLYIVKQPFVQTAQEEDACSCRF	
	251	
Человек (TNR9_HUMAN)	(246) PEEEEGGCEL	
Слон (XP_003413533)	(251) PEEEEGDCEL	
Кабан (XP_005665023)	(251) PEEEEGECCEL	

Фиг. 2

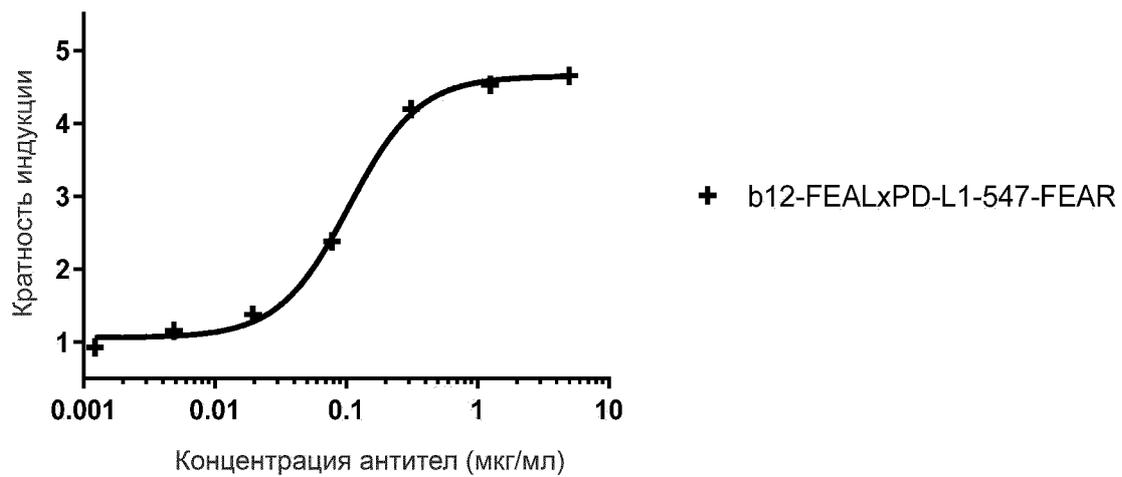




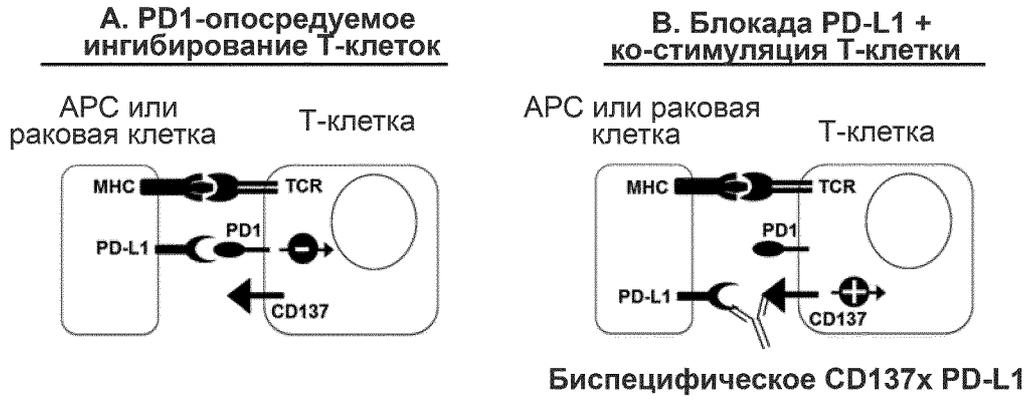
Фиг. 3



ФИГ. 4

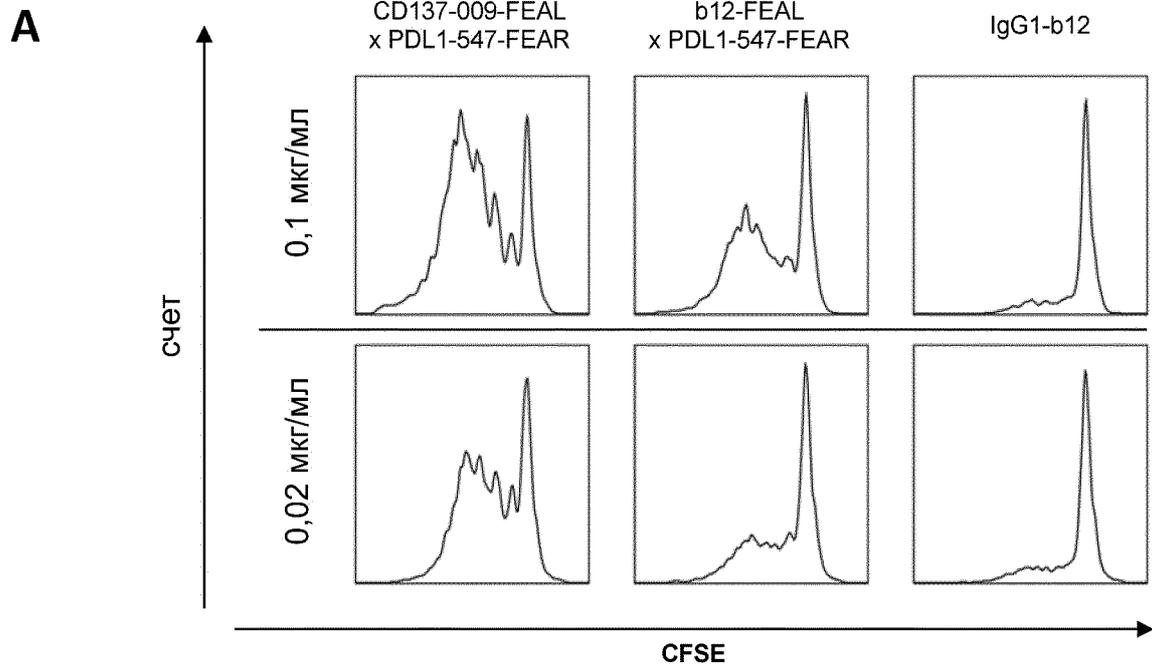
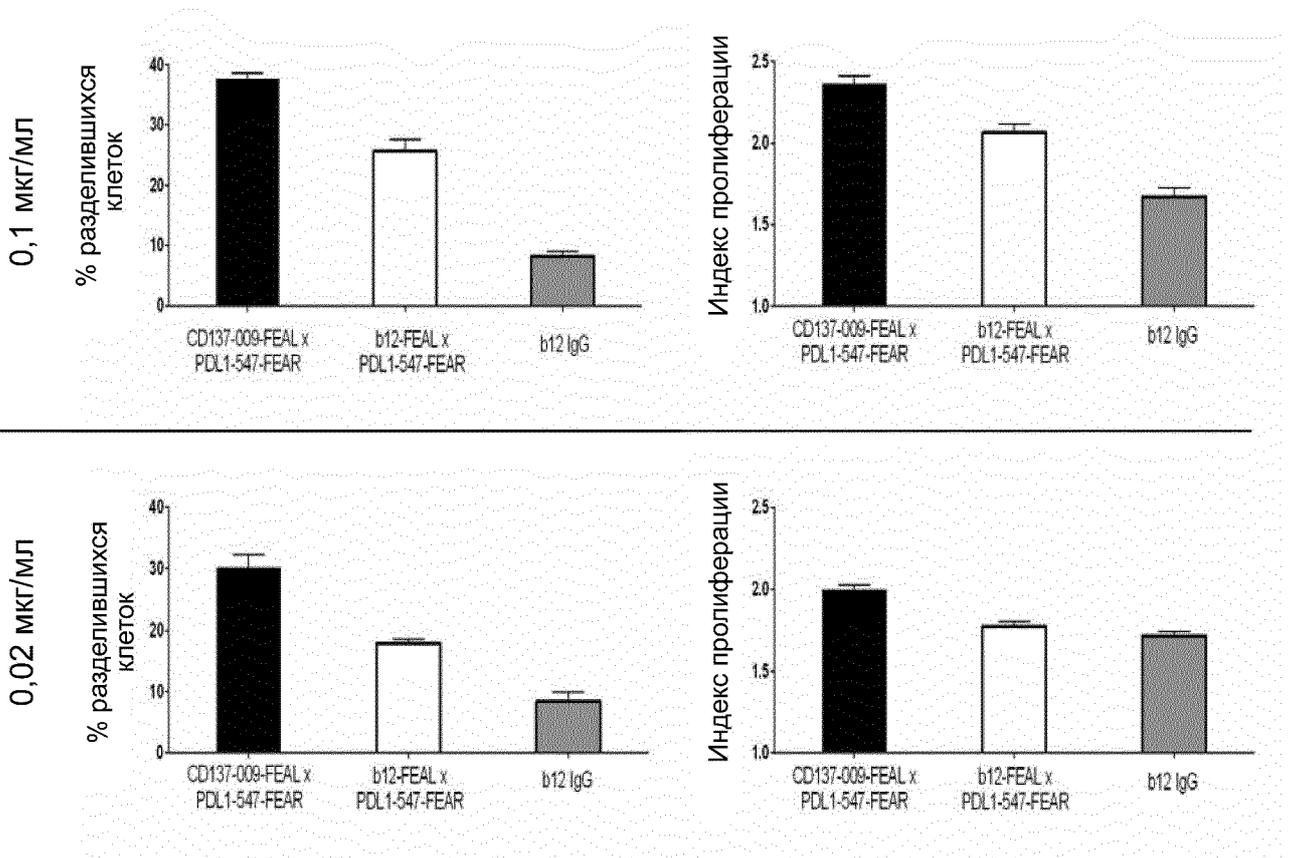


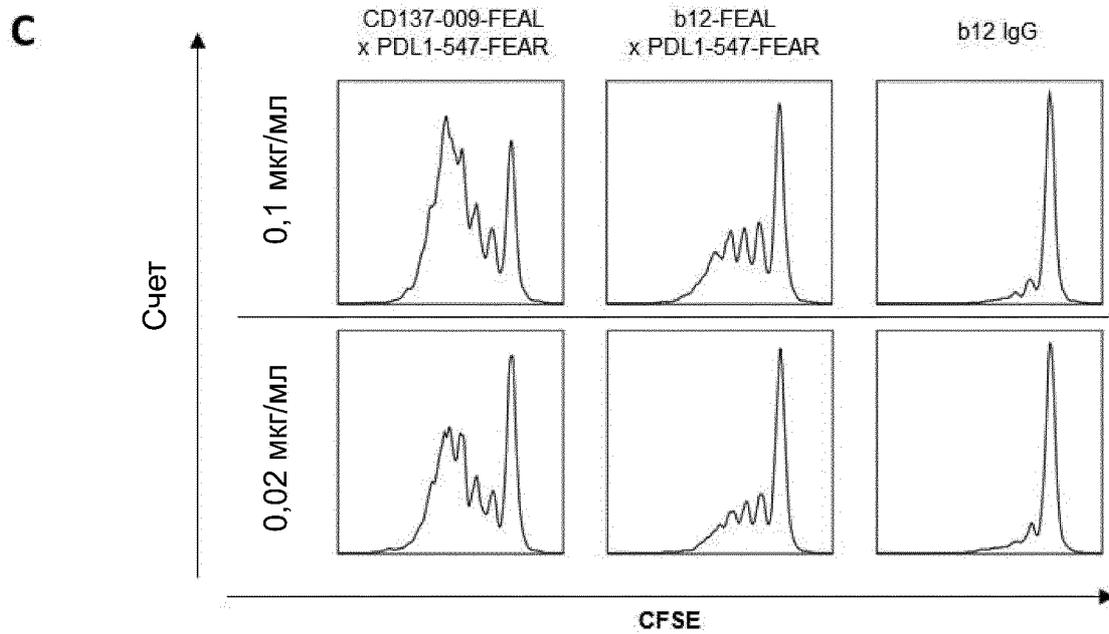
Фиг. 5



Фиг. 6

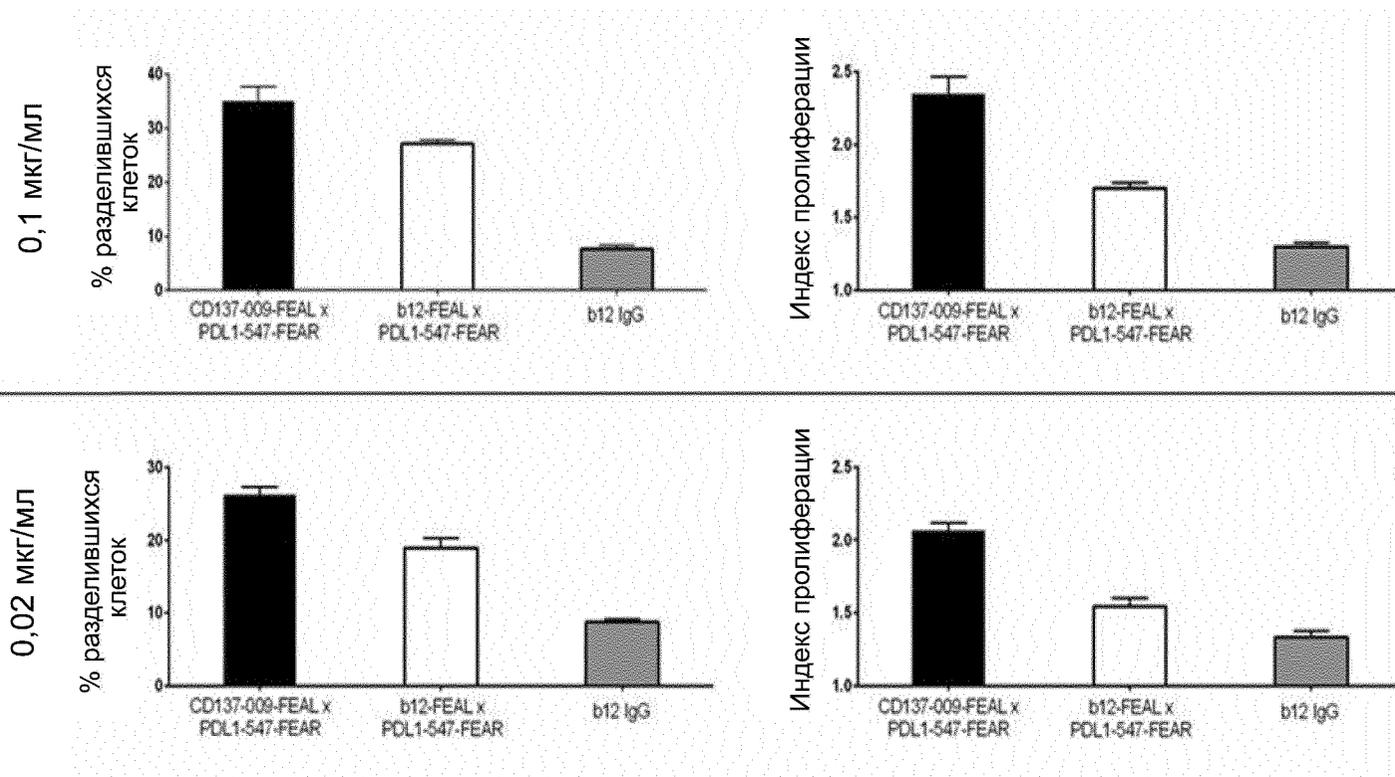
Фиг. 7

**B**



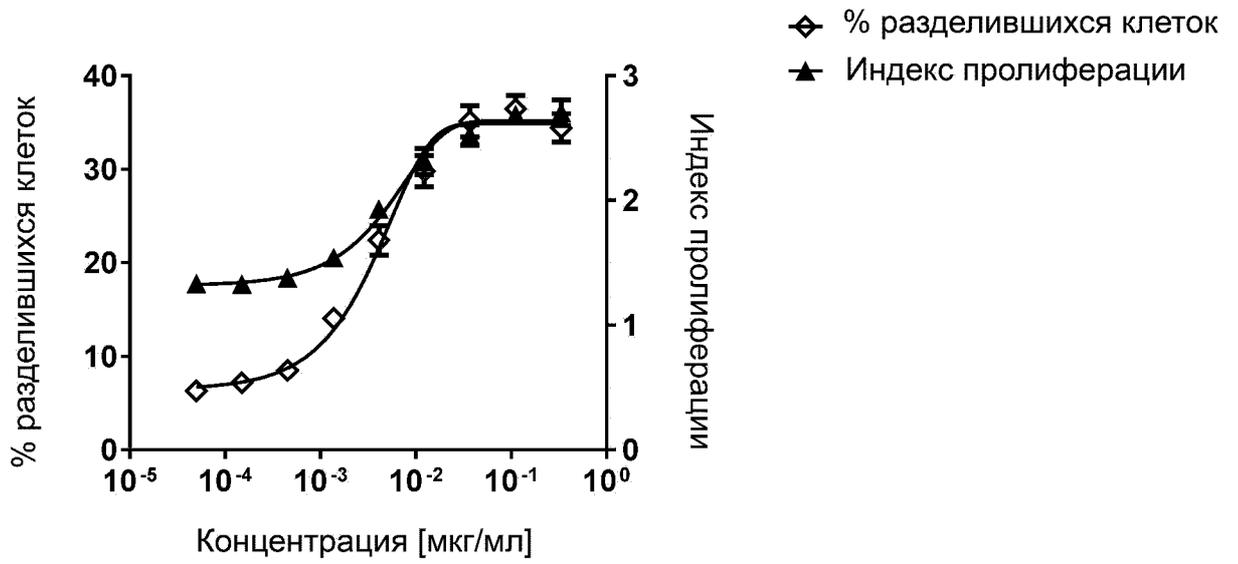
Фиг. 7 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

D



Фиг. 7 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

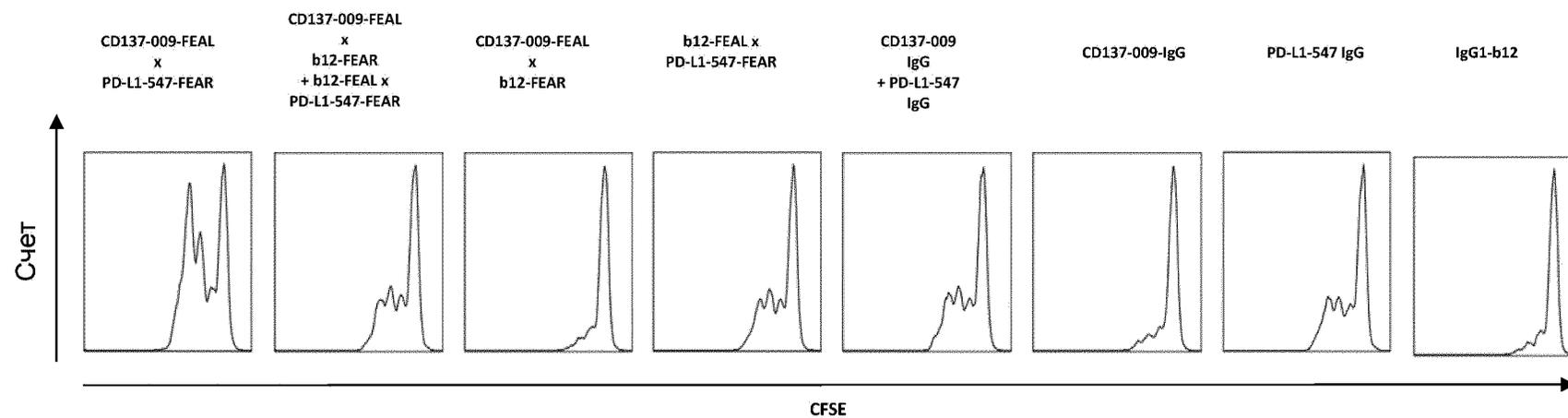
Фиг. 8



	% разделившихся клеток	Индекс пролиферации
EC₅₀	0.003492 мкг/мл	0.005388 мкг/мл

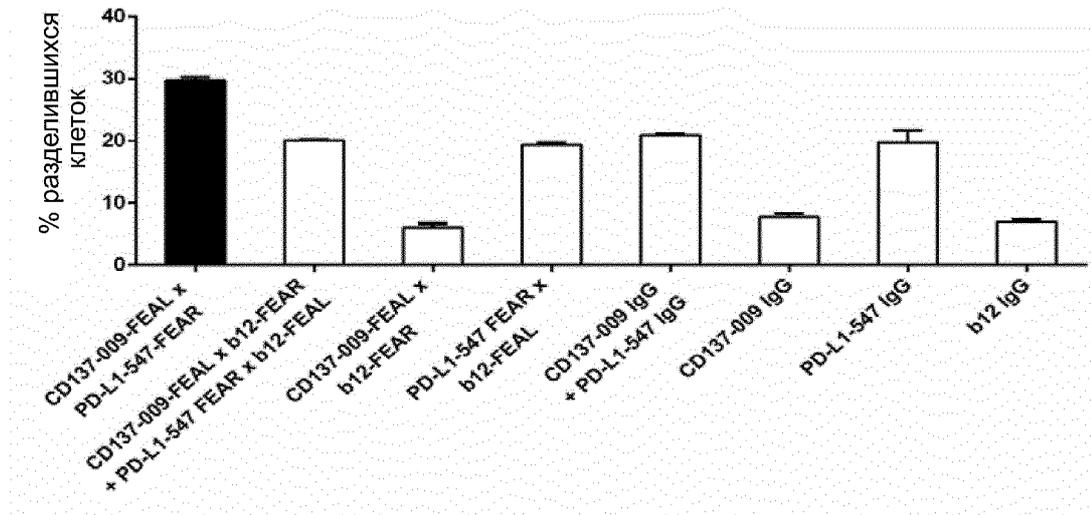
A

Фиг. 9

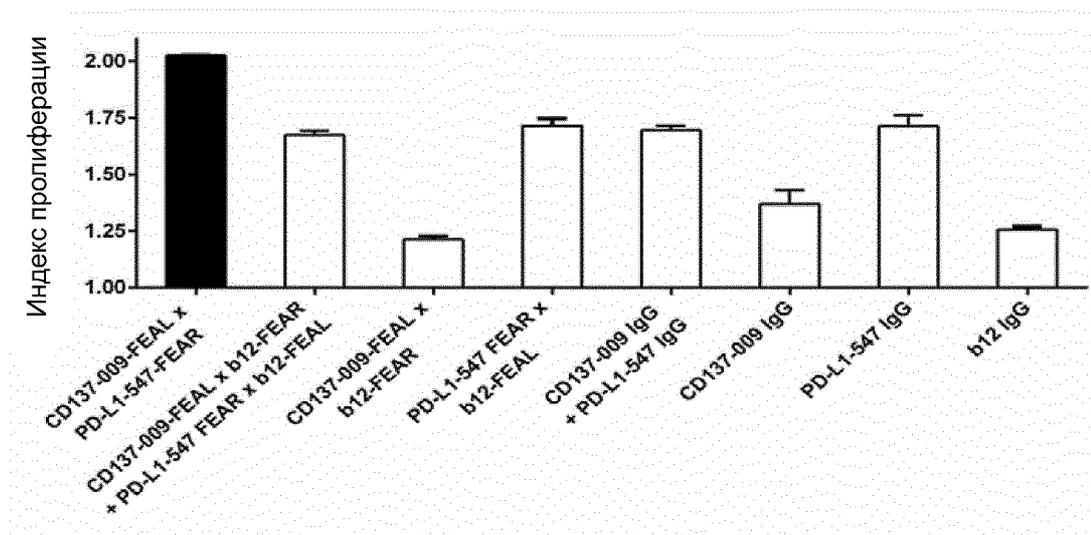


Фиг. 9 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

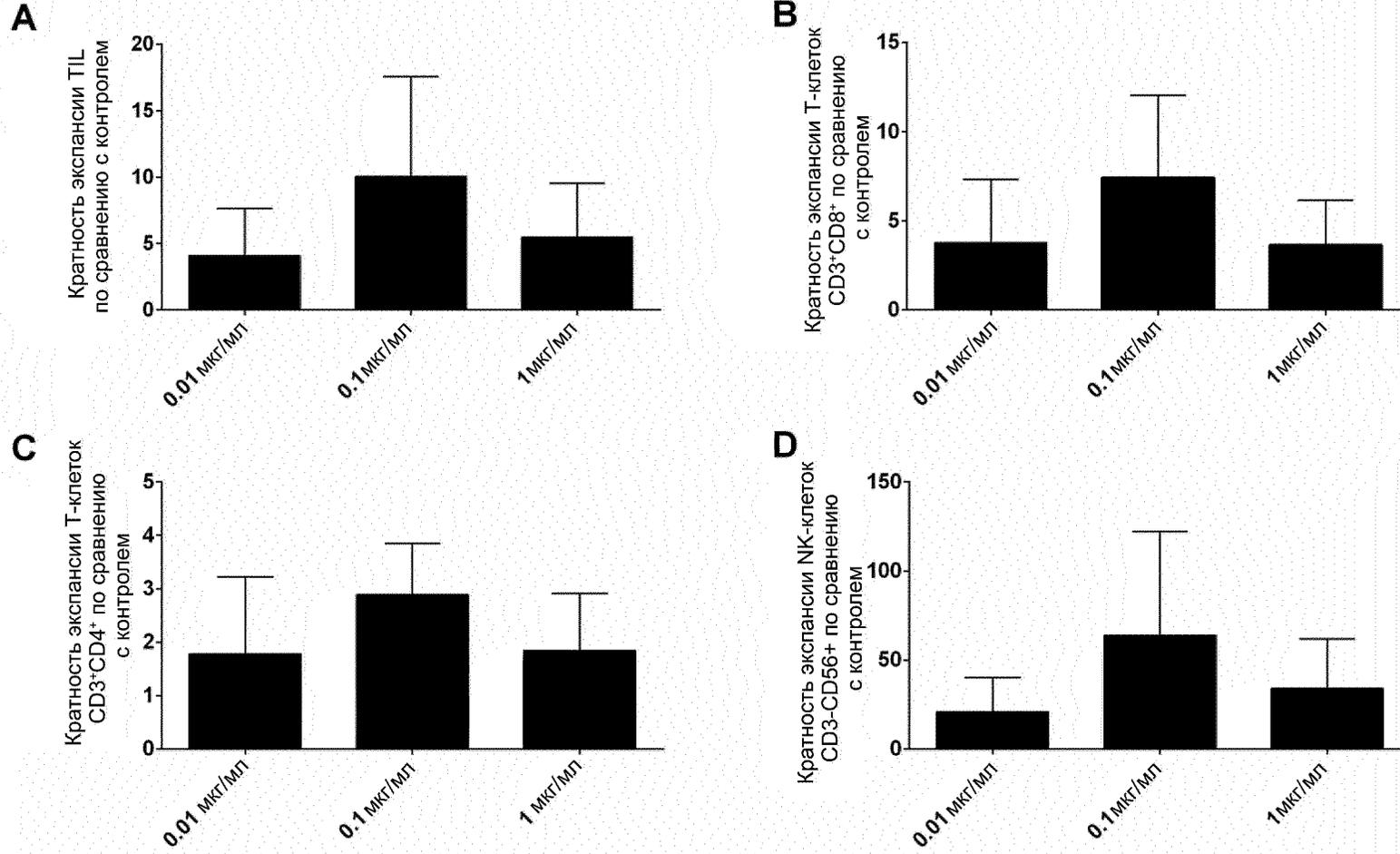
В



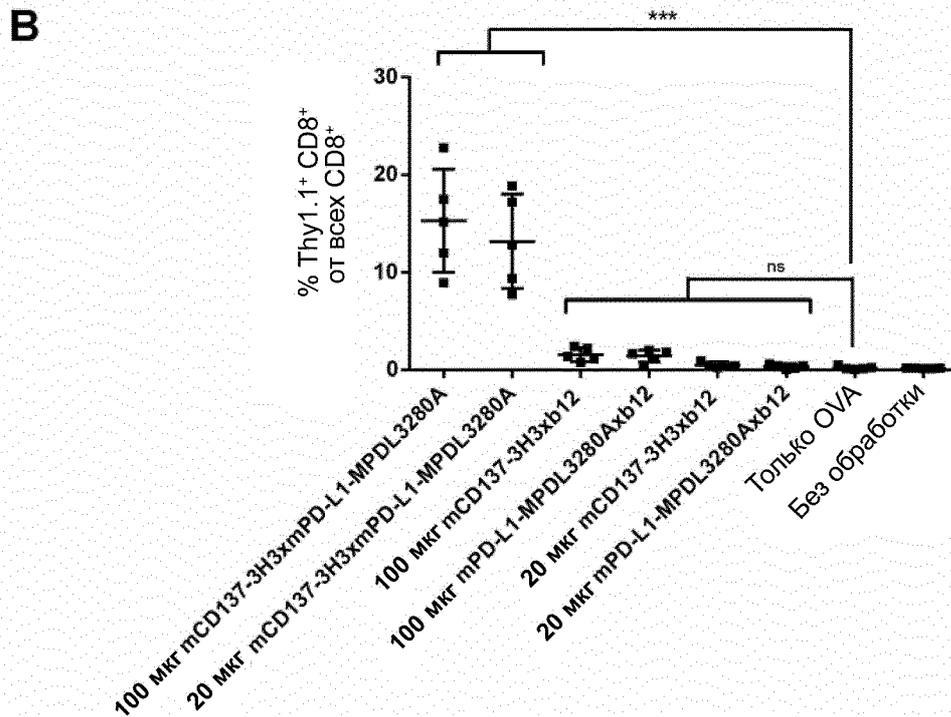
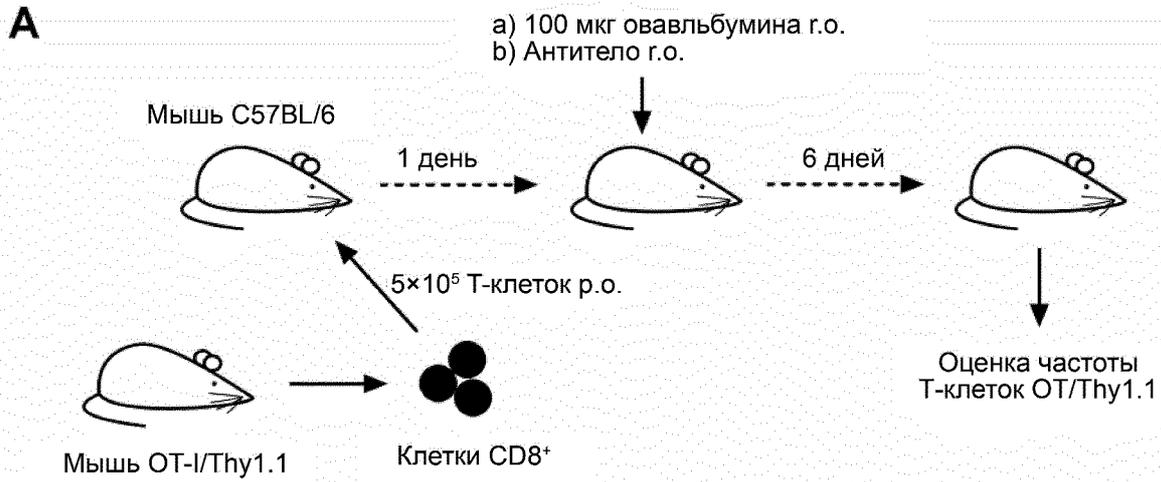
С



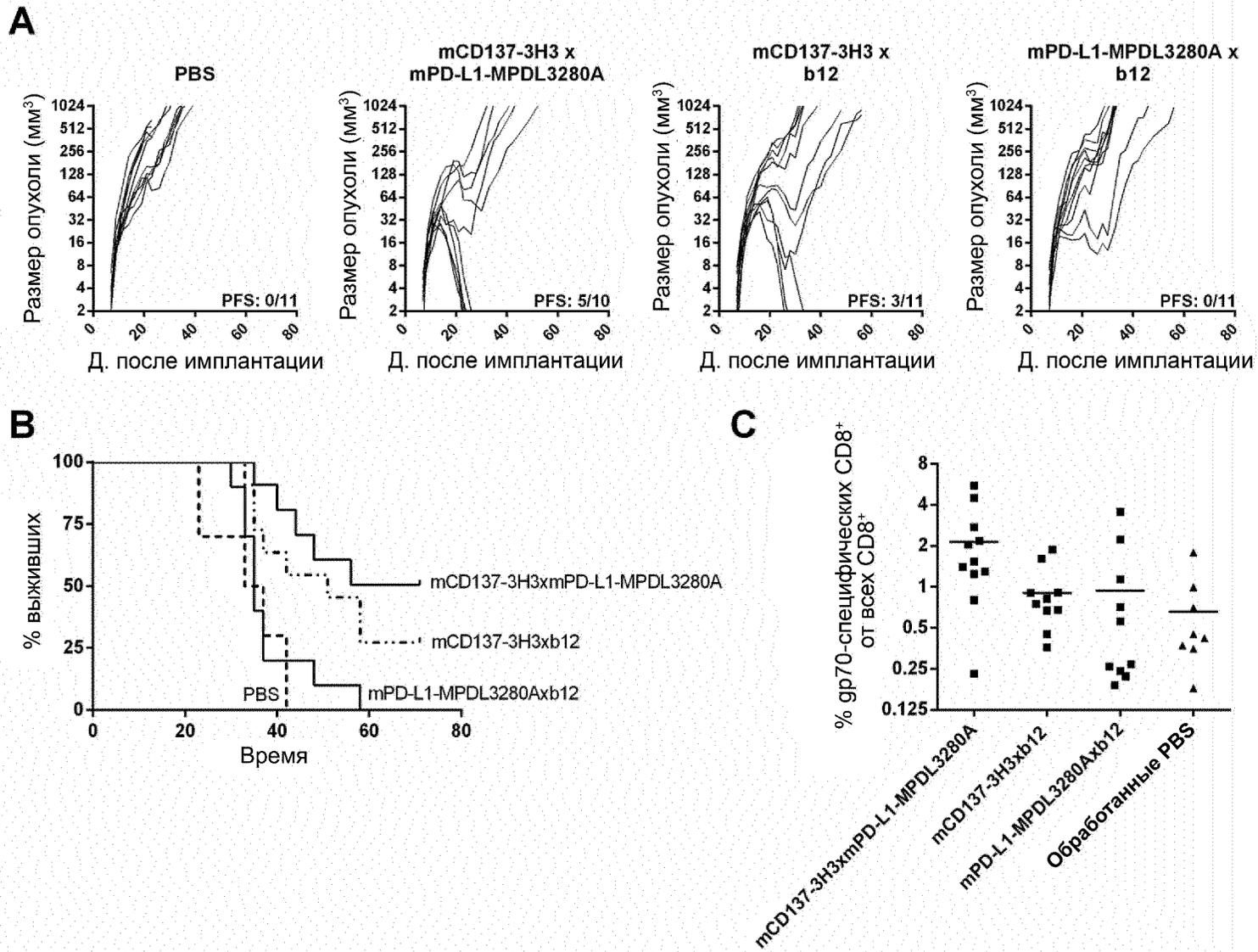
Фиг. 10



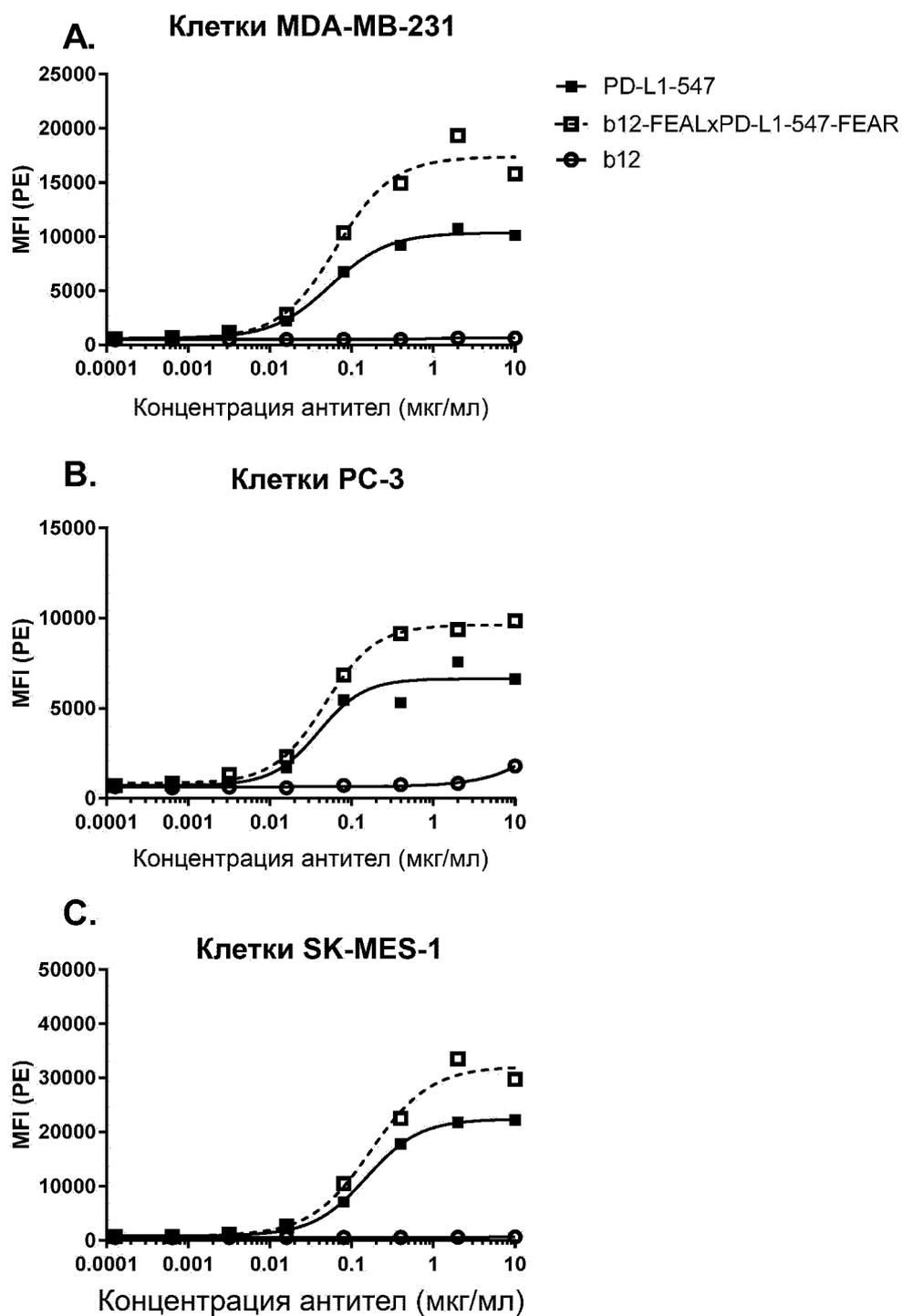
Фиг. 11



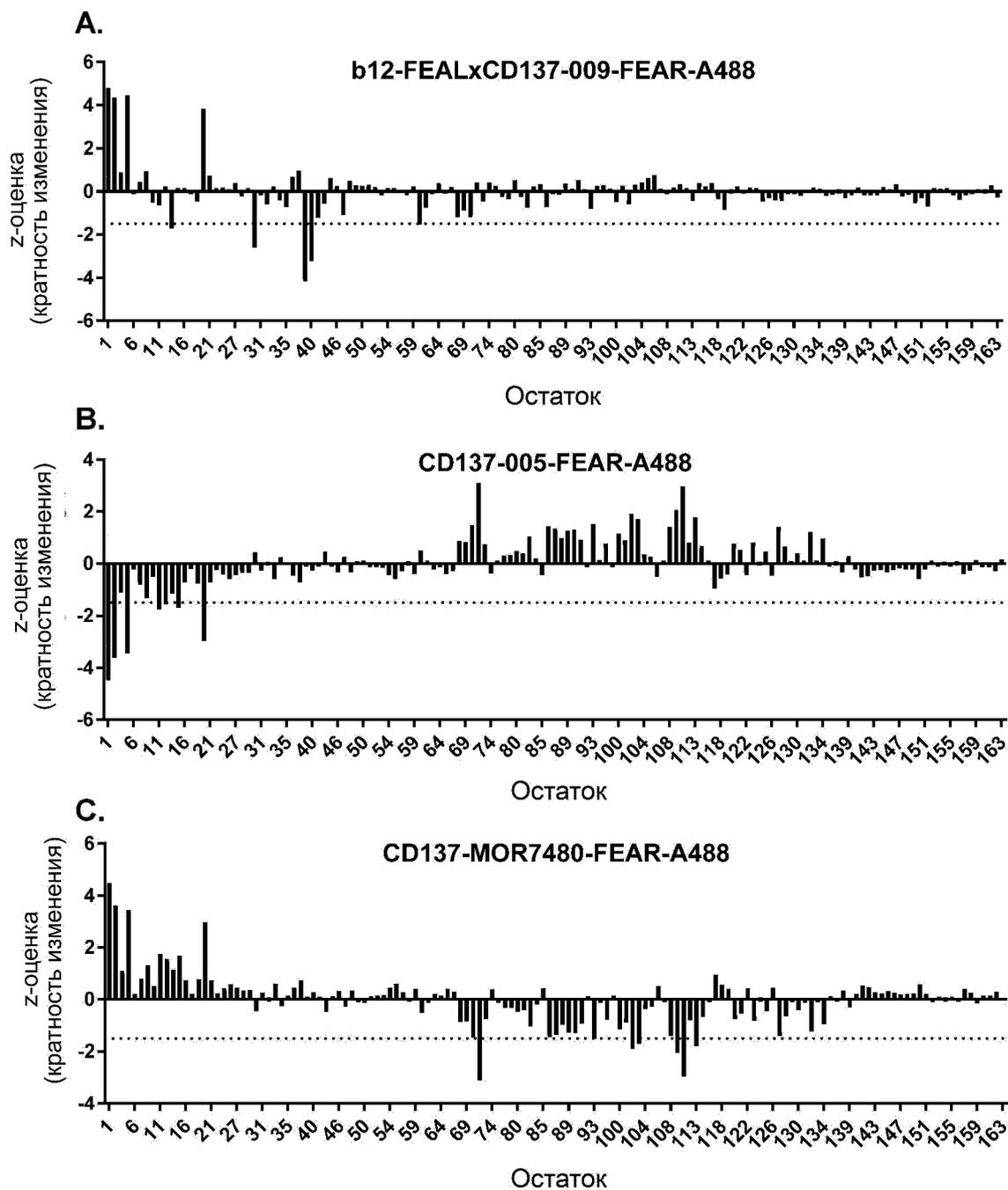
Фиг. 12



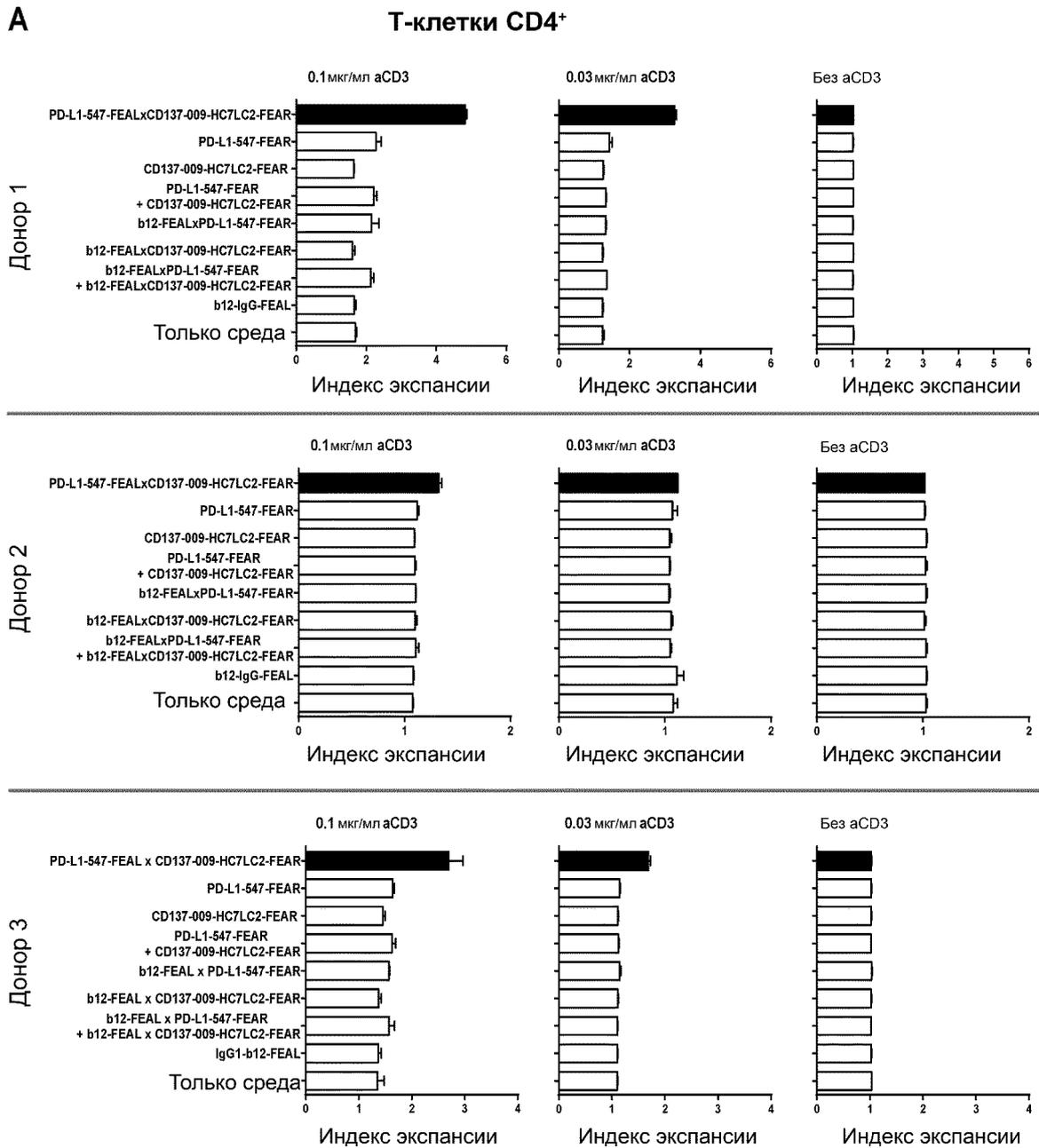
Фиг. 13



Фиг. 14

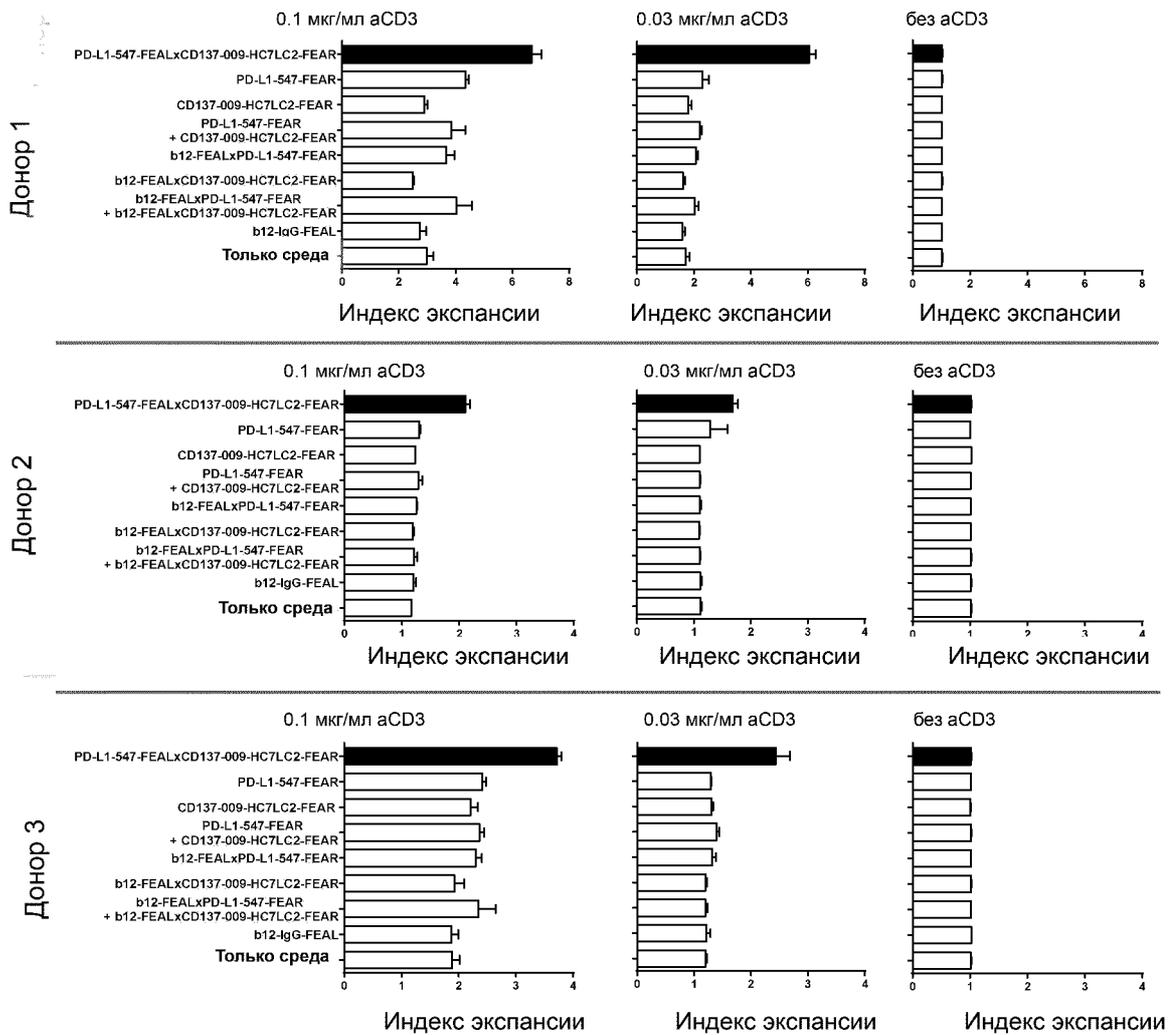


Фиг. 15

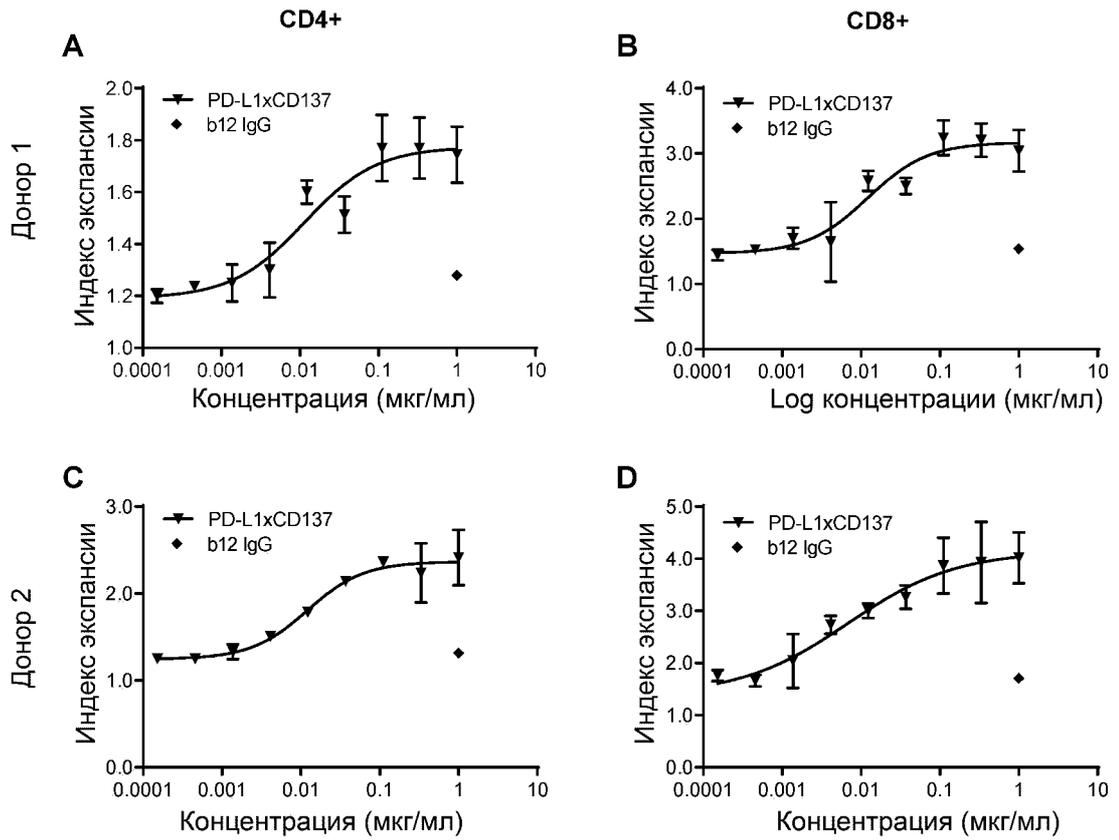


Фиг. 15 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

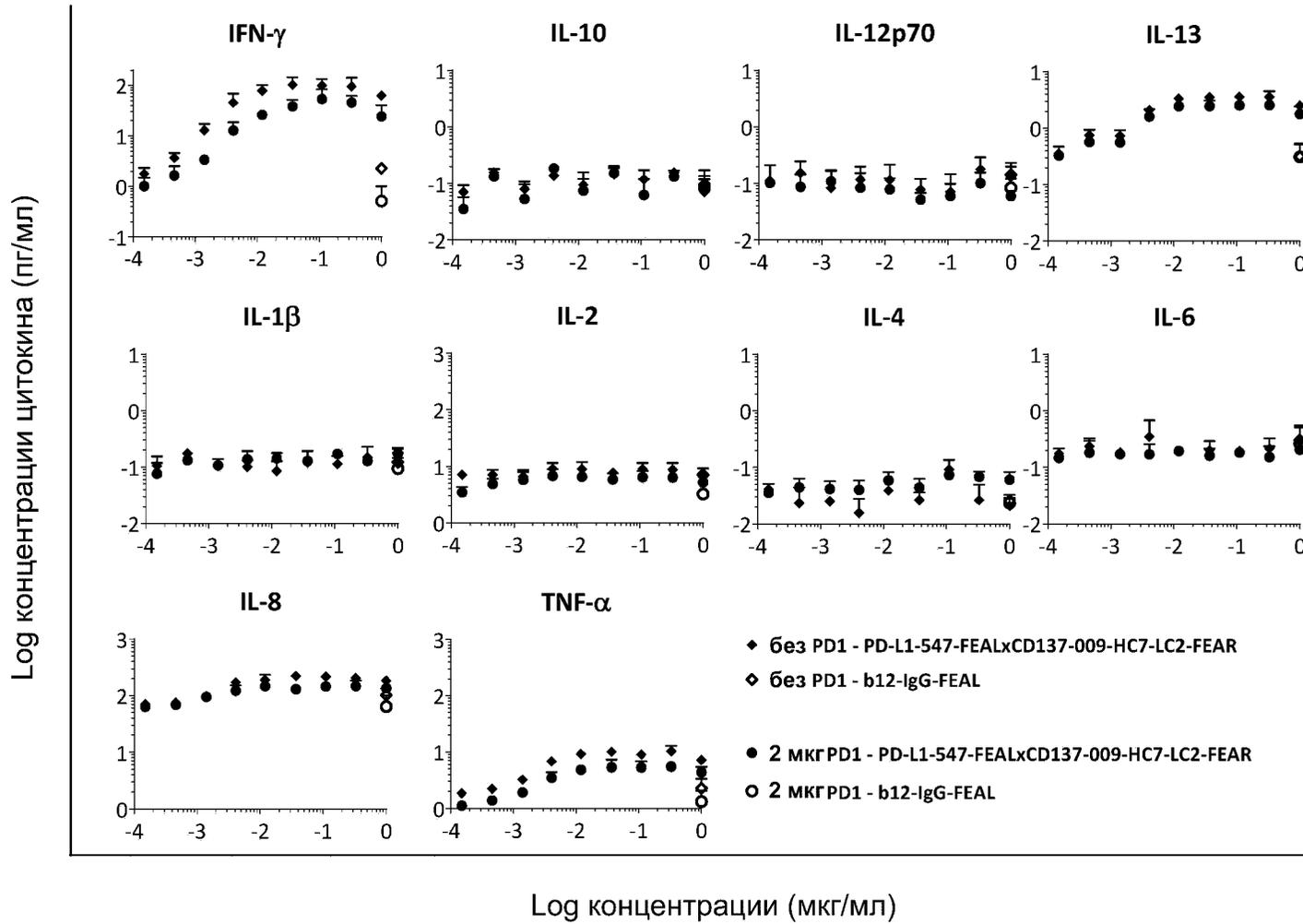
Т-клетки CD8⁺



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

