

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092265** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.12.24

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

(22) Дата подачи заявки
2019.03.15

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD137 ДЛЯ КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ PD-L1**

(31) 62/647,016

(72) Изобретатель:

(32) 2018.03.23

Карпенито Кармине, Ли Ивэнь (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/022391

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2019/182878 2019.09.26

(71) Заявитель:

ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(57) Данное изобретение относится к антителам, которые связываются с CD137 человека, проявляют агонистическую активность и могут быть полезны для лечения солидных и гематологических опухолей в виде монотерапии и в комбинации с антителами против PD-L1 человека, химиотерапией и ионизирующим излучением.

202092265

A1

A1

202092265

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565036EA/032

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD137 ДЛЯ КОМБИНАЦИИ С АНТИТЕЛАМИ ПРОТИВ PD-L1

Данное изобретение относится к области медицины. В частности, данное изобретение относится к агонистическим антителам, направленным на CD137 человека (SEQ ID NO: 1), которые можно комбинировать с антителами, направленными на PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26), комбинациям композиций, содержащих такие агонистические антитела против CD137 человека или антитела против PD-L1 человека, и способам использования таких агонистических антител против CD137 человека в комбинации с антителами против PD-L1 человека для лечения солидных и гематологических опухолей отдельно или в комбинации с химиотерапией и другими лекарственными средствами против рака.

Опухолевые клетки избегают обнаружения и устранения иммунной системой с помощью множества механизмов, некоторые из которых включают в себя манипуляции с путями иммунных контрольных точек. Пути иммунных контрольных точек используются для поддержания аутоотолерантности и регуляции активации Т-лимфоцитов, но раковые клетки могут влиять на эти пути, чтобы продлить выживаемость опухоли. Путь запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1)/лиганда 1 запрограммированной клеточной гибели 1 человека (PD-L1) является одной из таких иммунных контрольных точек. PD-1 человека экспрессируется на Т-лимфоцитах, и было показано, что связывание PD-L1 или PD-L2 с PD-1 ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов и продуцирование цитокинов. Более того, известно, что некоторые опухоли экспрессируют PD-L1 и PD-L2, и такая экспрессия может способствовать ингибированию внутриопухолевого иммунного ответа. Также было показано, что у некоторых пациентов развивается адаптивная резистентность к анти-PD-L1 лечению, в то время как у некоторых вообще не возникает ответа.

В настоящее время известно, что усиление противоопухолевого иммунного ответа может быть эффективным средством лечения рака. В этом отношении, CD137, также известный как 4-1BB, принадлежит к семейству рецепторов ФНО и играет роль в активации иммунных ответов Т-лимфоцитов, таких как регуляция пролиферации и эффекторных функций Т-лимфоцитов, ингибирование индуцированной активацией гибели клеток, и стимулирование иммунологической памяти. Антагонистические антитела, нацеленные на CD137, продемонстрировали свою перспективность в мышинных опухолевых моделях в качестве монотерапии (Melero. I. et al., Nat. Med. (1997) 3(6):682-685); однако, антитела-агонисты, нацеленные на CD137 человека, еще не продемонстрировали достаточного количества объективных ответов в качестве монотерапии или комбинированной терапии у пациентов-людей. В связи с этим ни утомилумаб (mAb IgG2, агонист CD137 человека) (Fisher, T.M. et al, Cancer Immunol. Immunother. (2012) 61:1721-1733), ни урелумаб (гуманизированное mAb IgG4, агонист

CD137) (Segal, *NH Clin. Cancer Res.* (2017) 23(8):1929-1936) не получили официального разрешения для применения в качестве монотерапии или в качестве комбинированной терапии с антителами против PD-L1. В действительности, ни одно агонистическое антитело, нацеленное на CD137 человека, не было одобрено для терапевтического применения на людях.

Несмотря на отсутствие официального разрешения, комбинация утомилумаба и авелумаба исследуется на пациентах с неизлечимыми злокачественными новообразованиями (NCT03217747). Однако, все еще существует потребность в улучшенных антителах человека, которые агонизируют рецептор CD137 человека и способствуют устойчивому противораковому иммунному ответу, демонстрируют приемлемые профили токсичности и могут быть комбинированы с препаратами антител против PD-L1 человека.

Кроме того, использованию ранее описанных агонистических антител, нацеленных на CD137, в качестве монотерапии рака и/или агента комбинации могут препятствовать такие факторы, как агонистическая сила указанных антител и/или связанные с иммунной системой нежелательные явления, которые возникают в результате их применения в более высоких дозах, возможно необходимых для эффективности. В частности, ранее раскрытые антитела либо слишком активные, что приводит к нежелательным явлениям, либо демонстрируют неоптимальную эффективность, что ограничивает их сочетаемость с препаратами анти-PD-L1 антител. В данном документе описаны новые антитела человека, которые агонизируют рецептор CD137 человека и обладают улучшенной комбинацией полезных фармакологических свойств. В частности агонистические антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, являются сконструированными человеческими, Fc γ -рецептор-опосредуемыми не эффекторными антителами, которые связывают CD137 человека и CD137 яванского макака, стимулируют активацию Т-лимфоцитов *in vitro*, способствуют экспрессии на клеточной поверхности CD137 человека, усиливают активность NF-каппа В, ингибируют рост опухоли на опухолевой мышечной модели немелкоклеточного рака легкого в качестве монотерапии, ингибируют опосредованную регуляторными Т-лимфоцитами супрессию *in vitro*, активируют желаемый профиль экспрессии иммунных генов, увеличивают количество внутриопухолевых CD3⁺ Т-лимфоцитов, конкурируют с лигандом CD137 человека за связывание с CD137 человека и связываются с уникальными аминокислотными остатками на CD137 человека. В этом отношении, агонистические антитела, нацеленные на CD137, раскрытые в данном документе, обеспечивают преимущество в комбинации с антителом против PD-L1 человека в опухолевых мышечных моделях.

Неограничивающие примеры известных антител против PD-L1 человека для использования в комбинациях согласно данному изобретению включают в себя атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, BMS-936559 и Антитело В (ранее описанное в WO2017/034916). В некоторых примерах, Антитело В содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и

вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых примерах, Антитело В содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

Неограничивающие примеры полезных химиотерапевтических агентов для использования в комбинациях, описанных в данном документе, включают в себя 5-фторурацил, гидроксимочевину, гемцитабин, метотрексат, доксорубин, этопозид, карбоплатин, цисплатин, циклофосфамид, мелфалан, дакарбазин, таксол, камптотecin, FOLFIRI, FOLFOX, доцетаксел, даунорубин, паклитаксел, оксалиплатин и их комбинации.

В контексте данного документа, термин «антитело» относится к полипептидному комплексу, имеющему две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC) таким образом, что тяжелые цепи и легкие цепи соединены между собой дисульфидными связями; при этом указанное антитело является антителом подкласса IgG.

Антитела-агонисты CD137 для применения в данном изобретении представляют собой сконструированный, не встречающийся в природе полипептидный комплекс. Молекула ДНК согласно данному изобретению представляет собой молекулу ДНК, которая содержит не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из полипептидов в антителе согласно данному изобретению.

Антитела против CD137 человека согласно данному изобретению представляют собой антитела типа IgG и имеют «тяжелые» цепи и «легкие» цепи, которые перекрестно сшиты внутри- и межцепочечными дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константной области тяжелой цепи («HCCR»). Каждая легкая цепь состоит из LCVR и константной области легкой цепи («LCCR»). При экспрессии в определенных биологических системах антитела, имеющие нативные Fc-последовательности, гликозилируются в Fc-области. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть гликозилированы и в других позициях.

Необязательно, антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, содержат Fc-часть, которую получают из IgG1 человека. Хорошо известно, что IgG1 связывается с белками семейства рецепторов Fc-гамма (FcγR), также как и с C1q. Взаимодействие с этими рецепторами может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Следовательно, необязательно, антитела против CD137 человека, описанные в данном документе, являются человеческими моноклональными антителами, лишенными эффекторной функции Fc (IgG1, Fc-нуль). Для получения Fc-нуль антитела IgG1 необходим селективный мутагенез остатков в пределах области CH2 его Fc-области IgG1. Для уменьшения связывания с FcγRI, FcγRIIa и FcγRIII в Fc IgG1 вносят аминокислотные

замены L234A, L235E и G237A, и для уменьшения C1q-опосредованной фиксации комплемента вносят замены A330S и P331S. Чтобы снизить потенциальную индукцию иммунного ответа при введении человеку, некоторые аминокислоты могут требовать обратных мутаций для соответствия последовательностям антител зародышевой линии.

Области HCVR и LCVR могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность («CDR»), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями («FR»). Каждая LCVR и HCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Для целей данного изобретения используются определения CDR Норта. Определение CDR Норта (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)) основано на кластеризации распределения аффинности с помощью большого количества кристаллических структур.

Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей HCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенная ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального соединения, ДНК, кодирующей LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда. Предпочтительно, для антител против CD137 человека согласно данному изобретению, константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа.

Полинуклеотиды, согласно данному изобретению экспрессируются в клетке-хозяине после функционального соединения последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Векторы экспрессии, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать маркеры отбора, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктаза, чтобы сделать возможным обнаружение этих клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК.

Описанные в данном документе антитела могут легко продуцироваться в клетках млекопитающих, неограничивающие примеры которых включают в себя клетки CHO, NS0, HEK293 и COS. Клетки-хозяева можно культивировать с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела, и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые могут изменяться в зависимости от типа клетки-хозяина.

Могут использоваться различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

В других вариантах осуществления данного изобретения, антитело или кодирующие его нуклеиновые кислоты предлагаются в выделенной форме. В данном контексте термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не содержат или по существу не содержат любые другие макромолекулярные компоненты, обнаруживаемые в клеточной среде. В контексте данного документа термин «по существу не содержат» означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат больше чем 80% (в мольном отношении) указанных макромолекулярных компонентов, предпочтительно - больше чем 90%, и более предпочтительно - больше чем 95%.

Антитело согласно данному изобретению, или содержащие его фармацевтические композиции, можно вводить парентеральными путями, неограничивающим примером чего является внутривенное введение. Антитело согласно данному изобретению может быть введено пациенту отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники (например, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и содержат антитело, как раскрыто в данном документе, и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

Режимы дозирования, для внутривенного (в/в) или не внутривенного введения, локализованного или системного, или их комбинаций, обычно будут варьироваться от однократной болюсной дозы или непрерывной инфузии до множества введений в сутки (например, каждые 4-6 часов) или по указанию лечащего врача и по состоянию пациента. Количество и частота дозирования могут быть определены врачами, которые лечат пациента.

Термин «лечение» (или «лечить», или «процесс лечения») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению

вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологии или заболевания.

«Эффективное количество» обозначает количество антитела согласно данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно данному изобретению, которое вызывает биологический или клинический ответ, или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, и способности антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективное количество также является таким, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любое токсичное или вредное воздействие антитела.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность кислотная последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); при чем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и/или при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак

пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почек.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом по меньшей мере одно из антител против CD137 человека и против PD-L1 человека вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1), в комбинации с эффективным количеством антитела

против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом при этом по меньшей мере одно из антител против CD137 человека и против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтическими агентами.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почек.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом по меньшей мере одно из антител против CD137 человека и против PD-L1 человека вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

В данном изобретении предложено антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом по меньшей мере одно из антител против CD137 человека и против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтических агентов.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2,

HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:7; при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, или светлоклеточный рак почек.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с

антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом по меньшей мере одно из антител против CD137 человека и против PD-L1 человека вводят в сочетании с ионизирующим излучением.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO:1) для изготовления лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; при этом по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтических агентов.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак желчных путей.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак толстой кишки.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак эндометрия.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак пищевода.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак желудка.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак головы и шеи.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак простаты.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак прямой кишки.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак щитовидной железы.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой холангиокарциному.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой аденокарциному легкого.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой плоскоклеточный рак легкого.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой светлоклеточный рак почек.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.

В данном изобретении предложено применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для использования в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; при этом рак представляет собой почечно-клеточный рак.

Характеризация антител, генерирование, экспрессия и очистка

Продукция антител с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 14, и полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 17, в клетках млекопитающих приводит к получению двух видов, связанных с продуктом антитела: (а) полноразмерное антитело (далее называемое «Антитело А1»), имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 10, и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 11; и (б) укороченную на одну аминокислоту форму антитела (далее называемую «Антитело А2»), полученную в результате отсечения n-концевого аланина легкой цепи, при этом указанное Антитело А2 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность легкой цепи, продемонстрированную в SEQ ID NO: 13. В контексте данного документа термин «Антитело А1/2» относится к продукту антитела, полученному в результате использования полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 17, и включает в себя комбинацию Антитела А1 (~6%) и Антитела А2 (~94%). Антитело А1 может быть синтезировано без значительных количеств Антитела А2 с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID

NO: 14, и полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 15. Антитело A2 может быть синтезировано без значительных количеств Антитела A1 с применением полинуклеотидной последовательности тяжелой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 14, и полинуклеотидной последовательности легкой цепи, продемонстрированной в SEQ ID NO: 16.

Антитела согласно данному изобретению могут быть сгенерированы с применением известных способов, включая, но не ограничиваясь фаговым дисплеем. Кроме того, антитела, полученные как описано выше, могут быть дополнительно подвергнуты скринингу с применением анализов, описанных в данном документе.

Полипептиды переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Антител A1, A2 и B, и кодирующие их нуклеотидные последовательности, перечислены в разделе, озаглавленном «Аминокислотные и нуклеотидные последовательности». Кроме того, SEQ ID NO для легкой цепи, тяжелой цепи, переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи Антител A1, A2, A1/2, приведены в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Соответствующая SEQ ID (аминокислотная)	Антитело A1	Антитело A2	Антитело B
Объект	CD137 человека	CD137 человека	PD-L1 человека
HCDR1	2	2	--
HCDR2	3	3	--
HCDR3	4	4	--
LCDR1	5	5	--
LCDR2	6	6	--
LCDR3	7	7	--
HCVR	8	8	22
LCVR	9	12	23
Тяжелая цепь	10	10	24
Легкая цепь	11	13	25

Таблица 2

Соответствующая SEQ ID (ДНК)	Антитело A1	Антитело A2	Антитело A1/2
HC	14	14	14
LC	15	16	17

Антитела согласно данному изобретению, включая, но не ограничиваясь Антителами A1, A2, A1/2, и B, могут быть получены и очищены по существу следующим

образом. Соответствующая клетка-хозяин, такая как НЕК 293 или СНО, может быть временно или стабильно трансфицирована экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимальное предварительно определенное соотношение векторов НС:LC или одну векторную систему, кодирующую как НС, так и LC. Очищенная среда, в которую происходит секреция антитела, может быть очищена, используя любой из многих обычно применяемых методов. Например, среда может быть удобно нанесена на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (рН 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, градиентом рН (например, от 20 мМ Трис-буфера рН 7 до 10 мМ цитратного натриевого буфера рН 3,0, или от фосфатно-солевого буфера рН 7,4 до 100 мМ глицинового буфера рН 3,0). Обнаружение фракций антител может быть проведено, например, с помощью УФ-поглощения или ДСН-ПААГ электрофореза, а затем проведено их объединение. Дополнительная очистка является необязательной, в зависимости от предполагаемого применения. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано с применением обычных методов. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены обычными методами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт может быть незамедлительно заморожен при -70°C или может быть лиофилизирован.

В контексте данного документа термин BMS20H4.9 относится к антителу, имеющему тяжелую цепь, продемонстрированную в SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, продемонстрированную в SEQ ID NO: 19, и ранее описанному в US7288638. В контексте данного документа термин PF83 относится к антителу, имеющему тяжелую цепь, продемонстрированную в SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, продемонстрированную в SEQ ID NO: 21, и ранее описанному в US 8337850.

Антитело A1/2 связывается с CD137 человека

Способность антител, раскрытых в данном документе, связывать CD137 человека может быть измерена с помощью ИФА. Для измерения связывания с CD137 человека 96-луночную плашку (Nunc) покрывают CD137 человека-Fc (R&D Systems) в течение ночи при 4°C . Лунки блокируют в течение 2 ч с помощью блокирующего буфера (ФСБ, содержащего 0,2% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Tween-20). Лунки могут быть трижды промыты ФСБ, содержащим 0,05% Tween-20. Антитело A1/2 или контрольный IgG (100 микролитров) затем добавляют в различных концентрациях и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки, плашку инкубируют с 100 микролитрами конъюгата козьего антитела против IgG человека F(ab')₂-HRP (Jackson Immuno Research Laboratories) при комнатной температуре в течение 45 минут. Плашки промывают и затем инкубируют со 100 мкл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина. Поглощение при 650 нм измеряют на считывающем устройстве для

микроплашек SpectraMax®. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) может быть рассчитана с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, Антитело A1/2 связывает CD137 человека с EC_{50} 0,027 нМ.

Антитело A1/2 связывается с CD137 яванского макака

Способность антител, описанных в данном документе, связываться с находящимся на клеточной поверхности CD137 яванского макака может быть измерена с применением проточной цитометрии. Стабильные клетки, экспрессирующие CD137 яванского макака, получают трансфекцией плазмидной ДНК рецептора Суно-CD137 в клетки человека 293 (ATCC) с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пурамицина в модифицированной по Дульбеко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Для проточной цитометрии слипшиеся прилипшие клетки отделяют с помощью буфера диссоциации клеток Gibco® (Life Technologies), блокируют в буфере FACS (забуференном фосфатом физиологическом растворе, содержащем 3% эмбриональной бычьей сыворотки) в течение 1 ч при 4°C, а затем переносят в 96-луночную круглодонную плашку при плотности 1×10^5 клеток/луночка. Добавляют Антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека (разведенный в буфере FACS 1:4, начиная с 0,5 микрограмм/мл) (100 микролитров), и клетки окрашивают в течение 1 часа при 4°C.

После промывки в буфере FACS добавляют вторичное антитело - конъюгированное с R-фикоэритрином козье антитело против IgG человека, специфичное к F(ab')₂ фрагменту (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:200 и клетки инкубируют при 4°C в течение 30 минут. Клетки промывают и проводят окрашивание живых/мертвых клеток с применением набора LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain Colour (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Клетки промывают в буфере FACS и обрабатывают в системе скрининга IntelliCyt HTFC®. Данные проточной цитометрии анализируются с применением программного обеспечения FlowJo®. Соотношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) рассчитывают как (СИФ Экспериментального антитела)/(СИФ контрольного IgG).

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, Антитело A1/2 в концентрации 0,5 мкг/мл демонстрирует более высокое соотношение СИФ, равное 153, по сравнению с BMS20H4.9 (соотношение СИФ 0,94) и PF83 (соотношение СИФ 37).

Связывание Антитела A1/2 на клетках человека увеличивает экспрессию CD137

Способность антител, раскрытых в данном документе, модулировать уровни находящегося на клеточной поверхности CD137 человека может быть определена следующим образом. Стабильные клетки, экспрессирующие CD137 человека, получают трансфекцией плазмидной ДНК CD137 человека в клетки 293 человека (ATCC) с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) в соответствии с протоколом

производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пуромицина в модифицированной по Дульбеко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Антитела к CD137, начиная с концентрации 300 наномоль в среде, инкубируют с клетками при 37 °С в течение 24 часов. Клетки промывают ФСБ, отделяют с применением буфера диссоциации клеток Gibco® и окрашивают теми же антителами к CD137 в холодном буфере (1x ФБС, 1% БСА, 0,09% азида натрия) в течение 2 часов. После промывки клетки окрашивают козьим антителом против IgG человека, конъюгированным с Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), в течение 30 минут. Клетки промывают и дифференциально помечают Zombie Green Live/Dead (BioLegend) в соответствии с протоколом производителя. Все клетки обрабатывались на Fortessa X-20. Анализ выполняется с помощью программного обеспечения FlowJo® для генерирования средней интенсивности флуоресценции (СИФ) Alexa Fluor 647 и калибруется по значениям МЭРФ (молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома) стандартной кривой Alexa Fluor 647 (Bangs Laboratories). Значения МЭРФ нормализованы к необработанным окрашенным контролям (100%) и необработанным окрашенным изотип-контролям (0%).

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, Антитело A1/2 в концентрации 300 наномоль вызывает увеличение (21%) уровня CD137 по сравнению с PF83 (12%), тогда как BMS20H4.9 снижает уровень CD137 на поверхности клетки на 56%.

Анализ активности люциферазного репортера NF-каппа-В Антитела A1/2

Способность антител, раскрытых в данном документе, активировать NF-каппа-В может быть измерена следующим образом. Двойной стабильный люциферазный репортер NF-каппаВ/CD137-293 человека получают трансфекцией плазмидной ДНК pGL4.32 [luc2P/NF-каппаВ-RE/Hygro] (Promega) в клетки 293, экспрессирующие CD137 человека, с применением реагента Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies) по протоколу производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 100 мкг/мл гигромицина и 0,5 мкг/мл пуромицина в модифицированной по Дульбеко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Клетки высевают в 384-луночную плашку при плотности 5×10^3 клеток/луночка, используя дозатор реагентов Thermo MultiDrop Combi (Thermo Fisher Scientific), и культивируют в течение ночи при 37°С. Антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека разводят в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с применением Hamilton STAR™ (Hamilton Company) в 10-точечных 2-кратных разведениях в пределах плашки, начиная с 9 микромоляр или 1,33 микромоляр, и переносят к клеткам. Затем клетки инкубируют с антителами в течение 5,5 ч при 37°С в 5% CO₂ и затем обрабатывают, используя люциферазную систему анализа ONE-Glo™ (Promega™) и комбинированный дозатор реагентов Thermo™ Scientific MultiDrop™ Combi. Люминесценцию измеряют с применением устройства для считывания микроплашек SpectraMax® (Molecular Devices), а анализ данных проводят с применением Genedata Screener® (Genedata). Данные нормализуют следующим образом: % Активности =

[(Значение лунки - Медиана минимального контроля)/(Медиана максимального контроля - Медиана минимального контроля)] x 100%.

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, Антитело A1/2 проявляет максимальную активность 78%, которая выше, чем PF83 (максимальная активность составляет 12%), и ниже, чем BMS20H4.9 (максимальная активность составляет 115%).

Антитело A1/2 стимулирует выработку продуцируемого Т-лимфоцитами интерферона-гамма

Способность антител, раскрытых в данном документе, стимулировать выработку интерферона-гамма (ИФН-гамма), продуцируемого Т-лимфоцитами, можно измерить следующим образом. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека выделяют из цельной крови или лейкопаков центрифугированием в градиенте плотности фикола (Ficoll® Raque PLUS; GE Healthcare) и выращивают в среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Life Technologies), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone). Антитела против CD3 человека, клон HIT3a (BD Biosciences) в ФСБ наносят на 96-луночную плашку (типичный диапазон: от 2 до 15 нанограмм/лунка) и инкубируют в течение ночи при 4°C. После аспирации лунки промывают ФСБ, и МКПК человека наносят на 96-луночную плашку с плотностью $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Антитело A1/2, BMS20H4.9, PF83 или контрольный IgG1 человека готовят путем разведения 1:4 в RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, с начальной концентрацией 80 мкг/мл. Клон CD28.2 антитела против CD28 человека (BioLegend) добавляют в плашку (обычный диапазон от 0,2 до 2 микрограмм/мл) с последующим тестированием антитела и инкубируют в течение 96 ч при 37°C в инкубаторе, увлажненном с 5% CO₂. Супернатанты собирают и уровни ИФН-гамма человека измеряют с применением набора ИФА для ИФН-гамма человека DuoSet от R&D Systems®. Вкратце, антитело для захвата ИФН-гамма наносят на плашку (4 мкг/мл) в течение ночи при комнатной температуре. После аспирации и промывания плашку блокируют в течение 1 час при комнатной температуре. Супернатанты-образцы и стандарт ИФН-гамма добавляют и инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывки добавляют 100 мкл антител, детектирующих ИФН-гамма, инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре и промывают. Стрептавидин-HRP (100 мкл разведения 1:40) добавляют в течение 20 минут при комнатной температуре. После промывки плашки проявляют путем добавления 100 мкл раствора субстрата в течение 20 минут с последующим добавлением 50 мкл стоп-раствора, и сигнал измеряют при 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов SpectraMax®. Анализ данных выполняется с применением программного обеспечения SoftMax Pro и GraphPad Prism (GraphPad Software). Кратность ингибирования рассчитывают как среднее значение ИФН-гамма (пг/мл) образца/среднее значение ИФН-гамма контроля hIgG1 (пг/мл).

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, Антитело A1/2 усиливает субоптимальную активацию МКПК человека путем костимуляции

CD3/CD28, измеренную по продукции цитокинов ИФН-гамма. В связи с этим обработка Антителом A1/2 при 5 мкг/мл приводит к увеличению продукции ИФН-гамма в 3,8 раза, что выше, чем PF83 (в 1,6 раза), и ниже, чем BMS20H4.9 (увеличение в 9,4 раза).

Анализ твердофазного связывания Антитела A1/2

Связывание Антитела A1/2 с C1q человека может быть измерено с применением анализа ИФА. Антитело A1/2 и контрольные антитела (отрицательный контрольный IgG1) серийно разводят в ФСБ и наносят на плашки для ИФА в течение ночи при 4°C. C1q человека в казеиновом буфере добавляют в концентрации 10 мг/мл и инкубируют в течение 2 часов. C1q человека детектируют путем инкубации плашек с C1q-HRP человека (AbD Serotec Inc., разведение 1:200) в течение 1 часа, и плашки проявляют с применением ТМБ (KPL, Inc.). Поглощение измеряют при 450 нм с помощью гибридного многорежимного считывателя Synergy Neo2 (BioTek®).

Связывание Антитела A1/2 с FcγRI, FcγRIIa(H), FcγRIIb, FcγRIIIa(F) и FcγRIIIa(V) определяют с применением анализа MSD (Meso Scale Diagnostics). Вкратце, рецепторы Fcγ наносят на плашку с Meso Scale в течение ночи, и серийно разведенные исследуемые антитела добавляют в плашку и инкубируют в течение 2 часов. Антитело A1/2 детектируют с применением вторичного антитела против человека (Meso Scale Diagnostics, D20TF-6), и плашку проявляют с помощью Read Buffer T (Meso Scale Diagnostics, R92TC-1). Люминесценцию измеряют с помощью SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Diagnostics), а данные анализируют с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

Таблица 3

Антитело	FcγRI (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIa(H) (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIb (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIIa(F)) (EC ₅₀ нМ)	FcγRIIIa(V)) (EC ₅₀ нМ)	C1q человек а (EC ₅₀ нМ)
Антитело A1/2	>5*	>134*	>134*	>134*	>134*	>330*
Положительный контроль IgG1 (эффекторная функциональность интактного рецептора Fc)	0,8	93,7	>134*	19	6,2	8,9

*Обозначает максимальную концентрацию исследуемого антитела

В экспериментах, выполненных, по существу, как описано выше, Антитело A1/2 не связывалось с FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIa или C1q (как продемонстрировано в Таблице 3 выше). В других экспериментах Антитело A1/2 не проявляло детектируемой эффекторной функции в анализах клеточной антителозависимой клеточной цитотоксичности и комплементзависимой цитотоксичности.

Противоопухолевая эффективность Антитела A1/2 в модели развившейся опухоли

Линия опухолевых клеток человека HCC827 немелкоклеточного рака легкого (ATCC) поддерживается в соответствующих средах и собирается для имплантации. Опухолевые клетки (1×10^7 клеток на мышь) вводят подкожно в правый бок самкам мышей NOD/SCID Gamma (NSG) в возрасте 7 недель (Jackson Laboratories). Когда опухоли достигают размера примерно от 350 мм^3 до 450 мм^3 , мышей рандомизируют в группы от 5 до 8. Размноженные Т-лимфоциты человека получают путем стимуляции наивных МКПК человека гранулами CD3/CD28 для размножения Т-лимфоцитов человека Dynabeads® (Thermo Fisher Scientific) в течение 9-10 дней и сохраняют в репозитории клеток. МКПК человека (NY Blood Center) готовят центрифугированием на Ficoll® Paque PLUS в пробирках SepMate (STEMCELL Technologies) и сохраняют в репозитории клеток. Размноженные Т-лимфоциты оттаивают и 1×10^6 клеток вводят мышам. В качестве контроля, в некоторых мышей имплантируют только опухолевые клетки без Т-лимфоцитов или МКПК. Обработка начинается в День 0 или День 1. Группы обработки включают в себя контрольный IgG, BMS20H4.9, PF83 и Антитело A1/2. Животным вводят внутрибрюшинной инъекцией 10 мг/кг антитела один раз в неделю в течение 4 недель. Массу тела (MT) регистрируют два раза в неделю, а процентное изменение MT рассчитывают по формуле: $(\text{MT в день наблюдения} - \text{MT в первый день}) / \text{MT в первый день} \times 100\%$. Объемы опухолей измеряют два раза в неделю с применением электронных штангенциркулей. Объем опухоли рассчитывают по формуле: $\text{объем опухоли (мм}^3) = \pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$. % Т/С рассчитывают по формуле $100 \times \Delta T / \Delta C$, если $\Delta T > 0$ средних геометрических значений. ΔT = средний объем опухоли в группе, получавшей лекарственное средство, в день наблюдения исследования - средний объем опухоли в группе, получавшей лекарственное средство, в начальный день введения дозы; ΔC = средний объем опухоли контрольной группы в день наблюдения исследования - средний объем опухоли контрольной группы в начальный день введения дозы. Статистический анализ данных об объеме опухоли выполняется с помощью двустороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями по времени и лечению с использованием процедур MIXED в программном обеспечении SAS (версия 9.2).

В экспериментах, выполненных, по существу, как описано выше, мыши, обработанные Антителом A1/2, продемонстрировали значительное ингибирование роста опухоли (Т/С% = 30,6; $P < 0,001$) в отличие от мышей, обработанных PF83 (Т/С% = 81,2) и BMS20H4.9 (Т/С% = 96,9), которые не показали ингибирования.

Результаты определения кинетики/аффинности для Антитела A1, Антитела A2 и Антитела A1/2

Прибор Biacore T200 может быть использован для измерения кинетики связывания иммобилизованного CD137-Fc человека с Антителом A1, Антителом A2 и Антителом A1/2. Рекомбинантный внеклеточный белок CD137-Fc человека (R&D Systems) ковалентно иммобилизован на сенсорном чипе CM5 посредством аминового связывания (GE Healthcare). Исследование антитела к CD137 проводится при скорости потока 30

микролитров/мин в буфере HBS-EP+. Образцы вводят в различных концентрациях, а измерения получают при 25°C. Поверхность регенерируют после каждого введения пробы 10-миллимолярным глицином-HCl pH 2,0 при скорости потока 30 микролитров/мин в течение 24 секунд, а затем стабилизируют буфером в течение 10 секунд. Сенсограммы концентраций в диапазоне от 0,123 наномоль до 30 наномоль оценивают с применением программного обеспечения Biacore T200. Расчет констант скорости ассоциации (K_a) и диссоциации (K_d) основан на соответствии модели связывания Ленгмюра 1:1. Равновесную константу диссоциации (K_D) или константу аффинности связывания рассчитывают из соотношения кинетических констант скорости K_d/K_a .

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, Антитело A1, Антитело A2 и Антитело A1/2 связываются с CD137 человека с константами кинетики и аффинности, приведенным в Таблице 4.

Таблица 4

Антитело	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_D (М)	R_{max}	χ^2
Антитело A2	1,33E+06	7,13E-03	5,36E-09	23,10	0,247
Антитело A1	1,61E+06	5,36E-03	3,33E-09	22,76	0,355
Антитело A1/2	1,52E+06	7,11E-03	4,67E-09	20,86	0,303

Люциферазный репортерный анализ NF-каппа-B, сравнивающий Антитело A1, Антитело A2 и Антитело A1/2

Способность антител, раскрытых в данном документе, активировать NF-каппа-B можно измерить, как описано ранее в данном документе, с той модификацией, что разведения антител готовят в ФСБ, а 10-точечные 2-кратные разведения проводят в плашке, начиная с 9 микромоль.

В экспериментах, выполненных по существу так же, как описано выше, Антитело A1/2 (максимальная активность 70,5%) проявляло аналогичную максимальную активность по сравнению с Антителом A1 (максимальная активность 63,4%) и Антителом A2 (максимальная активность 72,3%).

Антитело A1 и Антитело A2 способствуют образованию интерферона-гамма, продуцируемого Т-лимфоцитами

Способность антител, раскрытых в данном документе, стимулировать выработку интерферона-гамма (ИФН-гамма), продуцируемого Т-лимфоцитами, можно измерить, как описано ранее в данном документе. В экспериментах, проводимых, по существу, как описано в данном документе, Антитело A1, Антитело A2 и Антитело A1/2 усиливают суб-оптимальную активацию МКПК человека с помощью костимуляции CD3/CD28, как измерено по продукции цитокина ИФН-гамма. В связи с этим, обработка Антителом A1/2

при 5 мкг/мл приводит к увеличению выработки ИФН-гамма в 3,1 раза, что сопоставимо с Антителом А1 (увеличение в 3,5 раза) и Антителом А2 (увеличение в 3,5 раза).

Противоопухолевая эффективность Антитела А1 и Антитела А2 в модели развившейся опухоли

Способность антител, раскрытых в данном документе, ингибировать рост опухоли у мышей можно измерить, как описано ранее в данном документе.

В экспериментах, проведенных, как описано выше, Антитело А1, Антитело А2 и Антитело А1/2 ингибируют рост опухоли в НСС827 модели развившейся опухоли. Обработка Антителом А1/2 (Т/С% = 47,1%; $P < 0,001$) показывает такое же снижение роста опухоли, как и Антитело А1 (Т/С% = 56,0%; $P < 0,001$) и Антитело А2 (Т/С% = 48,7%; $P < 0,001$).

Эпитоп Антитела А1, определенный с помощью рентгеновской кристаллографии

А1-Fab Антитела очищают от супернатанта клеток 293НЕК, применяя аффинную матрицу CaptureSelect IgG-СН1 объемом 12 мл. ДСН-ПААГ электрофорез и аналитическая эксклюзионная хроматография (ЭХ) применяются для определения чистоты и качества очищенного Антитела А1-Fab. Элюированный материал этой матрицы замещают буфером с помощью 1X трис солевого буфера (ТБС). hCD137* (* (аминокислотные CD137 человека 22-161, ΔC121S)-AAA-6His) очищают от супернатанта 293НЕК в три этапа, в которых используются колонки Ni Sepharose® Excel, колонки Ni-NTA и колонки ЭХ. Вкратце, два литра супернатанта загружают непосредственно без замещения буфера в колонку с Ni-сефарозой Excel. Элюант этой стадии замещают ФСБ и дополнительно очищают, применяя колонку с гравитационным потоком Ni-NTA. Элюант этой стадии дополнительно очищают и замещают 1X ТБС с применением препаративной колонки ЭХ. Поток от первого шага Ni-сефарозы Excel содержит значительное количество hCD137*. Затем он загружается в колонку с Ni-сефарозой Excel, за которой следуют колонки Ni-NTA и препаративные колонки ЭХ. ДСН-ПААГ электрофорез применяют для объединения фракций hCD137* в зависимости от их чистоты. Концентрация hCD137* составляет 14,5 мг/мл, а концентрация Антитела А1-Fab составляет 7,5 мг/мл.

Комплексы Антитело А1-Fab:CD137* объединяют в молярном соотношении 1:1 и затем подвергают гель-фильтрации на колонке, предварительно уравновешенной в 20-миллимолярном Трис, рН 8,0, 100-миллимолярном хлориде натрия. Полученный комплекс концентрируют до 12,5 мг/мл. После фильтрации комплекс Антитела А1-Fab:CD137 устанавливают в соотношении 1:1 в условиях скрининга с разреженными матричными кристаллами в плашках с «сидячей каплей» с применением жидкостного манипулятора Phoenix при температуре 21°C и 8°C. Крупные призматические кристаллы растут в одном состоянии в течение 4 дней в 1-молярном тринатриевом цитрате, рН 6,5 при 21°C. Кристаллы собирают и криоконсервируют в 20% глицерине и в резервуарах, устанавливают и мгновенно замораживают в жидком азоте, затем с применением

Advanced Photo Source, Argonne National Laboratory, образцы подвергают рентгеновскому скринингу и собирают данные. Данные по Антителу A1-Fab/hCD137* обрабатываются до 2,4 Å с применением набора программ CCP4 ([HYPERLINK \l "_ENREF_2" \o "Collaborative Computational Project, 1994 #144" Winn, M.D. et al. Acta. Cryst. 2011: D67, 235-242](#)). Кристалл принадлежит Пространственной группе P3₁21 с параметрами ячейки a=b=124,9 Å, b=112,7 Å, α=β=90° и γ=120°. Структура определяется методом молекулярной замены с помощью программы Phaser ([HYPERLINK \l "_ENREF_4" \o "McCoу, 2007 #288" McCoу, A.J. et al. J. Appl. Cryst. 2007 40: 658-674](#)) с применением внутренней структуры Fab в качестве модели поиска. Решение молекулярной замены для Fab уточняется с помощью Refmac ([HYPERLINK \l "_ENREF_2" \o "Collaborative Computational Project, 1994 #144" Winn, M.D. et al. Acta. Cryst. 2011: D67, 235-242; Murshudov, G.N. Act. Cryst. 2011: D67, 355-367](#)) и Buster ([HYPERLINK \l "_ENREF_1" \o "Bricogne, 2011 #146" Bricogne, G. et al. 2016; Buster Version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Let.](#)). Карты из уточнения используются для ручной сборки модели для CD137 с помощью программы COOT ([HYPERLINK \l "_ENREF_3" \o "Emsley, 2010 #142" Emsley, P. Acta Cryst. 2010: D66, 486-501](#)). Уточненные R-факторы составляют R=17,8%, Rfree=20,5%.

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано в этом анализе, воссоздают структуру комплекса Антитело A1-Fab:hCD137* и эпитоп/паратоп иллюстрируется в Таблице 5 ниже. В Таблице 5 перечислены остатки Антитела A1-Fab, которые находятся в пределах 6Å от перечисленных остатков на hCD137*. Тяжелая цепь Антитела A1-Fab имеет 57 контактов (срез 6 Å) с hCD137*, а легкая цепь имеет 18 контактов (срез 6 Å).

Таблица 5

CD137 человека (Эпитоп)	Антитело A1 Тяжелая цепь (Паратоп)	Антитело A1 Легкая цепь (Паратоп)
S55	Q62	--
Q59	Q62	--
D63	Q62	--
R66	F55	--
F72	F55	--
H93	T103	--
C94	T102, T103, A104, P105	--
L95	M101, T102, T103, P105, G106, T107	--
G96	L100, M101, T102, T103, P105, G106, T107	G92, N93
A97	M101, T102, P105, G106, T107	G92, N93, S94, F95, L97

G98	P105	G92, N93, S94, F95
C99	P105	--
S100	I52, F55, N59, M101, P105, T107	F95
M101	S31, I52, I54, F55, M101	--
C102	F55	--
E103	T103	--
L112	T103	--
T113	T103	--
K114	M101, T102, T103, A104	D51, D54
K115	L100, M101, T102, T103, D110	F50, E56, T57
G116	M101, T102, T103	F50

Антитело A1/2 полностью блокирует взаимодействия CD137/CD137-лиганд

Способность антител, раскрытых в данном документе, блокировать взаимодействия CD137 человека и CD137-лиганда (далее CD137L) может быть измерена с помощью анализа ИФА. Во-первых, анализ ИФА, используется для количественного определения связывания EC₅₀ hCD137** (CD137 человека аминокислот 22-164, ΔC121S)-AAA-FLAG к hCD137L* и Антителу A1/2, BMS20H4.9 и PF83. Лунки 96-луночной планки ИФА Immulon® 4HBX покрывают в течение ночи 50 нанограммами hCD137** в 100 мкл ФСБ, pH 7,2 с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования 5% ФСБ в ФСБТ и промывки была проведена серия пятикратных разведений (392-0,005 наномоль) His-меченного рекомбинантного CD137L человека (далее указанного как hCD137L*) (R&D Systems), (53-0,00068 наномоль) BMS20H4,9, (107-0,0014 наномоль) PF83 или (53-0,00068 наномоль) Антитела A1/2 добавляют с каждым разведением, проводимым в двух экземплярах, и инкубируют при слабом перемешивании в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем лунки, обработанные анти-CD137-антителами, промывают и добавляют конъюгированное с HRP козье антитело против Fab в разведении 1:10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories), и инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Затем лунки, обработанные hCD137L*, промывают и добавляют конъюгированное с HRP мышинное антитело против His в разведении 1:5000 (Sigma-Aldrich®) и планки инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМБ-пероксидазы применяли в соответствии с инструкцией производителя для визуализации и обнаружения сигналов. Показания абсорбции представлены на графике в GraphPad Prism Software Version 6. Значения EC₅₀ рассчитывали с помощью анализа подгонки кривой нелинейной регрессии функции программного обеспечения «Одно место - специфическая функция связывания». В экспериментах, проведенных, как описано, аффинности связывания (EC₅₀) с hCD137** были определены как 0,6 наномоль для hCD137L, 1,4 наномоль для Антитела 1/2, 0,43 наномоль для BMS20H4.9 и более 10 наномоль для PF83.

Способность hCD137L* конкурировать с BMS20H4.9, PF83 и Антителом A1/2 за связывание с hCD137** может быть определена следующим образом. 96-луночную плашку Immulon 4НВХ ELISA покрывают в течение ночи 50 нанограммами hCD137** в 100 мкл ФСБ, рН 7,2 с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования (с 5% БСА в ФСБТ) и промывки пятикратное разведение (196-0,0025 наномолярного) hCD137L* смешивают с насыщающими количествами указанного антитела: Антитело A1/2 (200 нанограмм/луночка), BMS20H4.9 (3 нанограмма/луночка) или PF83 (1000 нанограмм/луночка). Затем смеси добавляют в лунки в двух экземплярах и инкубируют при слабом перемешивании при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания плашку инкубируют с конъюгированным с HRP козьим антителом против Fab (разведения 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМБ-пероксидазы применяли в соответствии с инструкцией производителя для визуализации и обнаружения сигналов.

Процентное содержание мАт, которое остается связанным с CD137, нанесено на график, и значения IC₅₀ рассчитаны с помощью анализа подбора кривой нелинейной регрессии с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше, hCD137L* полностью блокирует связывание Антитела A1/2 с hCD137** с IC₅₀ 0,401 наномоль. hCD137L* также блокирует связывание PF83 с hCD137** с IC₅₀ 1,037 наномоль (30% сигнала связывания остается на поверхности). Нет измеримого эффекта hCD137L* на связывание BMS20H4.9 с hCD137**.

Антитело A1/2 связывает CD137 человека по определенным аминокислотным остаткам, которые отличаются от BMS20H4.9 и PF83

Точечные мутации CD137 человека вводят для определения аминокислотных остатков, по которым Антитело A1/2, BMS20H4.9 и PF83 связываются с CD137 человека. Мутанты CD137-Fc получают с применением стандартного протокола коммерчески доступного набора для сайт-направленного мутагенеза (набор Quickchange II, Qiagen). Белки CD137-Fc дикого типа и мутантные белки экспрессируют и очищают. Все указанные в данном документе мутанты имеют профиль исключения по размеру, сходный с таковым для CD137-Fc дикого типа (т. е. введенные мутации не нарушают структурную целостность белка). Чтобы определить влияние мутации на связывание антител, используют точечный ИФА-анализ против CD137-Fc дикого типа и мутантов. Лунки 96-луночной плашки Immulon 4НВХ ИФА покрывают в течение ночи 50 нанограммами CD137-ECD-C121S-Fc человека или его мутантов в 100 мкл ФСБ, рН 7,2, с легким перемешиванием при 4°C. После блокирования (с 5% БСА в ФСБТ) и промывки добавляют пятикратное разбавление восьмиточечной серии (100-0,00128 наномоль) указанного антитела и инкубируют с легким перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 часа. Лунки промывают и добавляют конъюгированное с HRP вторичное антитело (разведение 1:10000 козьего антитела против Fab, конъюгированного с HRP

(Jackson ImmunoResearch Laboratories), и инкубируют при комнатной температуре в соответствии со стандартным протоколом. Хромогенный субстрат и стоп-раствор ТМБ-пероксидазы применяли в соответствии с инструкцией производителя для визуализации и обнаружения сигналов. Показания поглощения для каждой точки концентрации нормированы по поглощению взаимодействия дикого типа. Для каждого мутанта определяется среднее нормализованного отношения для восьми концентраций.

Мутации индивидуально вводили в CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в позициях: P27, N42, D63, Q67, A97, G98, S100, M101, Q104, K114, K115, R130, I132, R134. Таблица 6 демонстрирует профили связывания BMS20H4.9 и Антитела A1/2 показанных для мутантов CD137 человека. Таблица 7 демонстрирует профили связывания PF83 и Антитела A1/2 показанных для мутантов CD137 человека. В совокупности Таблицы 6 и 7 демонстрируют, что Антитело A1/2 связывается с различными аминокислотными остатками на CD137 человека по сравнению с BMS20H4.9 и PF-83.

Таблица 6

	BMS20H4.9 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)	Антитело A1/2 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)
P27L*	85	100
N42S*	0	100
D63N	100	100
Q67R	100	100
Q67V	100	100
A97P	100	15
G98K	100	85
G98Q	100	100
S100T	100	100
M101R	100	100
Q104K	100	100
K114E	100	20
K115Q	100	25

*Обозначает положения, которые находятся вне эпитопа Антитела A1/2, как определено с помощью рентгеновской кристаллографии при 6Å

Таблица 7

	Антитело A1/2 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)	PF83 (% связывания относительно hCD137 дикого типа)
K115Q	25	100
R130A*	100	100
R130H*	100	100
I132V*	100	100

R134Q*	100	25
--------	-----	----

*Обозначает положения, которые находятся вне эпитопа Антитела A1/2, как определено с помощью рентгеновской кристаллографии при 6Å.

Экспрессия гена CD137 в опухолях человека

Профиль экспрессии гена CD137 в иммунных инфильтратах опухолей человека можно анализировать с применением базы данных Атласа генома рака (TCGA - The Cancer Genome Atlas) и вычислительных методологий. Вкратце, соотношения экспрессии CD137/CD3e получены на основе результатов TCGA RNASeq, подготовленных Omicsoft. Для сравнения соотношений экспрессии CD137/CD3e в образцах опухоли и соседних нормалей одной и той же ткани проводят t-тест и рассчитывают d Коэна для каждого типа опухоли. Типы опухолей, которые имеют значение $P < 0,05$ в t-тесте соотношения экспрессии опухоли к норме и большой размер эффекта $d > 0,8$ по Коэну, являются статистически значимыми. Разница в соотношении экспрессии CD137/CD3e в опухоли по сравнению с нормальной тканью рассчитывается как логарифмическое изменение (logFC).

В экспериментах, выполненных, как описано, повышенное соотношение CD137/CD3 в опухоли наблюдается при различных типах рака, включая, но не ограничиваясь этим, рак молочной железы, толстой кишки, эндометрия, мочевого пузыря, головы и шеи (Таблица 8). Опухоли, обогащенные лимфоцитами CD137⁺, являются кандидатами для терапии антителом CD137 с применением Антитела A1, Антитела A2 или Антитела A1/2.

Таблица 8

Рак	Коэффициент экспрессии CD137/CD3 (logFC)	Значение P
Мочевой пузырь	1,92	3,85E-03
Молочная железа	2,46	3,56E-39
Холангиокарцинома	1,78	4,81E-06
Толстый кишечник	2,36	1,23E-19
Эндометрий	2,14	4,01E-15
Пищевод	1,07	1,71E-04
Желудок	1,68	9,27E-10
Голова и шея	1,90	8,06E-15
Аденокарцинома легких	1,37	2,63E-13

Плоскоклеточный рак легкого	1,63	2,37E-13
Простата	1,04	2,73E-04
Прямая кишка	1,62	1,40E-05
Щитовидная железа	1,24	2,29E-06

Антитело A1/2 усиливает инфильтрацию опухоли CD3⁺ Т-лимфоцитами *in vivo*

Способность антител, раскрытых в данном документе, изменять инфильтрацию Т-лимфоцитов опухоли на гуманизированных моделях мышей может быть определена с помощью иммуногистохимии (ИГХ). Вкратце, линию клеток L55 немелкоклеточного рака легкого человека (L55-CBG-2A-GFP, Университет Пенсильвании) имплантировали мышам NSG. Когда опухоли достигают размера 250-300 мм³, вводят МКПК человека (8×10^6 клеток) и вводят антитела в дозе 10 миллиграмм/кг один раз в неделю в течение 4 недель. В конце исследования опухоли собирали в формалин, заливали в парафин, делали срезы и окрашивали антителом против CD3 (Cell Signaling Technology). Изображения получали при увеличении 200X с помощью Aperio XT ScanScope® и проводили полуколичественный анализ. Процент CD3-положительных клеток к общему количеству опухолевых клеток рассчитывали с применением программного обеспечения Aperio ImageScore. Результаты сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением метода Холма-Сидака для множественных сравнений (сигма-график 12,5, программное обеспечение Systat).

В экспериментах, выполненных, как описано выше, Антитело A1/2 индуцирует инфильтрацию CD3⁺ Т-лимфоцитов опухоли в развившихся опухолях L55. Процент CD3⁺ Т-лимфоцитов в ответ на Антитело A1/2 (60%) выше по сравнению с обработкой BMS20H4.9 (18%) или IgG человека (27%).

Комбинации Антитела A1/2 и Антитела В

Антитело A1/2 в комбинации с антителом против PD-L1 человека, Антителом В, могут быть протестированы с применением модели NCI-H292 Winn, модели HCC827 человека NSCLC и модели L55 человека NSCLC. Модель NCI-H292 Winn применяли следующим образом. Использовали самок мышей NOD/SCID Gamma (NSG) в возрасте 7 недель (Jackson Laboratories). Клеточную линию NCI-H292 человека NSCLC (ATCC; CRL-1848), культивированную в соответствующей среде, собирали при примерно 80-90% конфлюэнтности и суспендировали в HBSS при 10×10^6 клеток/мл. МКПК человека выделяли из единицы цельной крови, полученной из Центра крови Нью-Йорка, как описано ранее. МКПК объединяли с опухолевыми клетками NCI-H292 при соотношении опухолевых клеток к МКПК 4:1. Смесь центрифугировали, и осадок повторно суспендировали в HBSS в концентрации 10×10^6 клеток NCI-H292 и $2,5 \times 10^6$ МКПК на мл. Каждой мышке вводили подкожно в правый бок 0,2 мл раствора в День 0. В каждое исследование включали контрольную группу, получавшую только опухолевые клетки.

Мышей случайным образом рандомизировали в группы обработки от 5 до 8 мышей, и обработку начинали в День 0 или День 1. Группы обработки обычно включали в себя контрольный IgG, Антитело A1/2, Антитело против PD-L1 человека (Антитело В) и комбинации с Антителом A1/2 и Антителом В. Животным вводили внутривентриально дозу 10 мг/кг, если не указано иное, один раз в неделю в течение 4 недель. Антитело В вводили в дозе 0,25 мг/кг для модели Winn или 1 мг/кг для модели HCC827 один раз в неделю в течение 4 недель.

Линии опухолевых клеток НМРЛ человека HCC827 (ATCC; CRL-2868) и L55 НМРЛ человека (Университет Пенсильвании) поддерживали в соответствующих средах и собирали для имплантации. Опухолевые клетки (диапазон числа клеток 10×10^6 для HCC827 (HBSS) и 5×10^6 для L55 (смесь HBSS и матригеля 1:1) на мышь) вводили подкожно в правый бок самок мышей NOD/SCID Gamma (NSG) в возрасте 7 недель (Лаборатории Джексона). Когда опухоли достигали размера примерно от 250 мм^3 до 400 мм^3 , мышей рандомизировали в группы от 5 до 8 мышей. Размноженные Т-лимфоциты человека получали, как описано ранее. Размноженные Т-лимфоциты (от 3×10^6 до 8×10^6) или МКПК (от 5×10^5 до 8×10^6) размораживали и вводили мышам. В качестве контроля имплантировали только опухолевые клетки, без Т-лимфоцитов или МКПК. Обработку начинали либо в День 0, либо в День 1. Группы обработки обычно включали в себя контрольный IgG, Антитело A1/2, Антитело В, комбинацию Антитела A1/2 и Антитела В. Животным вводили внутривентриальную дозу 10 мг/кг (если не указано иное) один раз в неделю в течение 4 недель.

Для всех моделей массу тела (МТ) регистрировали дважды в неделю, процентное изменение МТ рассчитывали, как описано выше. Объем опухолей измеряли два раза в неделю с помощью электронных штангенциркулей, и объем опухоли рассчитывали, как описано выше. Кроме того, % Регрессии рассчитывали по формуле $=100 \times \Delta T / T_{\text{начальное}}$, если $\Delta < 0$. Животных, у которых опухоль не обнаруживали, расценивали как полные ответчики (ПО), а животных, у которых отмечали регрессию опухоли $\geq 50\%$, расценивали как частичные ответчики (ЧО). Статистический анализ данных об объеме опухоли выполняли с помощью двухстороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями по времени и обработке с применением процедур MIXED в программном обеспечении SAS (версия 9,2). Независимый анализ по Блисссу проводили для определения того, является ли эффект комбинированной обработки двумя тестируемыми соединениями аддитивным, большим или меньшим, чем добавка, по сравнению с одним агентом. Процент ответа составляет % дельта Т/С для объемов опухолей выше исходного уровня и % регрессии для объемов опухолей ниже исходного уровня. Различия (обработка одним агентом) - (комбинированная обработка) сравнивали. В экспериментах, проводимых, как описано, Антитело A1/2 в комбинации с Антителом В обеспечивало дополнительное ингибирование роста опухоли по сравнению с монотерапией Антителом A1/2 или Антителом В, как показано в Таблице 9.

Таблица 9

Исследовани е	Антитело A1/2 %Т/С, значение р	Антитело В %Т/К, значение р	Антитело A1/2+ Антитело В %Т/С, значение р	Комбинация по сравнению с Антителом A1/2*	Комбинация по сравнению с Антителом В*
H292 Winn	74,5, $p=0,419$	30,9, $p=0,002$	12,9, $p < 0,001$	$p < 0,001$	$p=0,052$
Развившаяся HCC827	13, $p < 0,001$	8, $p < 0,001$	регрессия - 45%	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Развившаяся L55	99,3, $p=0,832$	76,6, $p=0,079$	49,9, $p < 0,001$	$p < 0,001$	$p=0,003$

* метод независимого анализа по Блисссу

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO: 1 (CD137 человека)

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTK
KGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSV
TPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 2 (HCDR1)

KASGGTFSSY AIS

SEQ ID NO: 3 (HCDR2)

GIPIFGTANYAQKFQG

SEQ ID NO: 4 (HCDR3)

ARDLMTTAPGTYFDL

SEQ ID NO: 5 (LCDR1)

QASQDIGNSLG

SEQ ID NO: 6 (LCDR2)

FDASDLET

SEQ ID NO: 7 (LCDR3)

QQGNSFPLT

SEQ ID NO: 8 (HCVR)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDLMTTAPGTYFDLWG
RGTLVTV

SEQ ID NO: 9 (LCVR Антитела A1)

AIRMTQSPPSLSASVGDRTITCQASQDIGNSLGWYQQKPKAPKLVIFDASDLE
TGVPSRFSGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 10 (HC)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
 GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDLMTTAPGTYFDLWG
 RGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 11 (LC Антитела A1)

AIRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLE
 TGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 (LCVR Антитела A2)

IRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
 GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 13 (LC Антитела A2)

IRMTQSPPSLSASVGDRVITTCQASQDIGNSLGWYQQKPGKAPKLVIFDASDLET
 GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQGNSFPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 14 (ДНК HC)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
 TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGG
 TGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTT
 GGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGA
 ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCG
 TGTATTACTGTGCGAGAGATCTGATGACTACGGCCCCTGGGACGTACTIONCGATCTCT
 GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCACTG
 ACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTT
 GTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGCACCG
 TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
 CTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGACCAAGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCATCCTCCATC

GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
 GCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAT
 TCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
 GGGCAAATGA

SEQ ID NO: 15 (ДНК LC Антитела A1)

ATGAGGCTGCTGCCTCTGCTGGCCCTCCTGGCCCTGTGGGGCCAGACCCAG
 CCAGAGCCGCCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
 ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGT
 ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTG
 GAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCAAGTCT
 CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAA
 CAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGAAGTGCCTC
 TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
 GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
 AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 16 (ДНК LC Антитела A2)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCT
 CCACCGGCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA
 GAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGTATC
 AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTGGAA
 ACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCAAGTCTCACC
 ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAAACAGT
 TTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGAAGTGTGGCCGC
 ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT
 GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
 GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
 AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 17 (ДНК LC Антитела A1/2)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCT
 CCACCGGCATCCGGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
 ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGGCAACTCTTTAGGTTGGT
 ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCGTGATCTTCGATGCATCAGATCTG
 GAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCAAGTCT

CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGTAA
 CAGTTTCCCGCTCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGAACTGTGG
 CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
 ACTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
 GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
 CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 18 (HC BMS20H4.9)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHG
 GYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWFYDLWG
 RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
 PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 19 (LC BMS20H4.9)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
 TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20 (HC PF83)

EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPG
 DSYTNYSPSFQGGVTSADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVKCCVECP
 PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
 QPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 METDTLLLWVLLLWVPGSTGAIRMTQSPPSLSASVGDRTITCQASQDIGNSLGWYQ
 QKPGKAPKLVIFDASDLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGNS
 FPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
 VTKSFNRGECNNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 (LC PF83)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPS
 GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAA

PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 22 (HCVR Антитела B)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSPDYSPYYYYGMDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 23 (LCVR Антитела B)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGVSFVGGGIKLTVLG

SEQ ID NO: 24 (HC Антитела B)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGPIIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSPDYSPYYYYGMDV
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 25 (LC Антитела B)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGVSFVGGGIKLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO: 26 (PD-L1 человека)

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY
RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSD
HQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPPLA
HPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) в комбинации с эффективным количеством антитела против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26); причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

2. Способ по п. 1, где антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

3. Способ по п. 1, где антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

4. Способ по п. 1, где антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

5. Способ по п. 1, где антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где антитело против PD-L1 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

8. Способ по любому из пп. 1-5, где антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

10. Способ по любому из пп. 1-8, где рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

11. Способ по любому из пп. 1-8, где рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтических агентов.

14. Антитело против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для применения в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) при лечении рака, причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

15. Антитело против CD137 человека для применения по п. 14, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

16. Антитело против CD137 человека для применения по п. 14, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

17. Антитело против CD137 человека для применения по п. 14, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

18. Антитело против CD137 человека для применения по п. 14, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

19. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-18, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

20. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-18, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

21. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-18, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность. SEQ ID NO: 25.

22. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-21, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

23. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-21, отличающееся тем, что рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

24. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-21, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи или почечно-клеточный рак.

25. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-24, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

26. Антитело против CD137 человека для применения по любому из пп. 14-25, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтических агентов.

27. Применение антитела против CD137 человека (SEQ ID NO: 1) для производства лекарственного средства для лечения рака, причем лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно с антителом против PD-L1 человека (SEQ ID NO: 26) антитело; причем антитело против CD137 человека содержит HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

28. Применение по п. 27, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

29. Применение по п. 27, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

30. Применение по п. 27, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

31. Применение по п. 27, отличающееся тем, что антитело против CD137 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

32. Применение по любому из пп. 27-32, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека представляет собой атезолизумаб, дурвалумаб или авелумаб.

33. Применение по любому из пп. 27-32, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

34. Применение по любому из пп. 27-32, отличающееся тем, что антитело против PD-L1 человека содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

35. Применение по любому из пп. 27-34, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желчных путей, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, рак прямой кишки или рак щитовидной железы.

36. Применение по любому из пп. 27-34, отличающееся тем, что рак представляет собой холангиокарциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого или светлоклеточный рак почки.

37. Применение по любому из пп. 27-34, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи, или почечно-клеточный рак.

38. Применение по любому из пп. 27-37, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

39. Применение по любому из пп. 27-38, отличающееся тем, что по меньшей мере одно из антитела против CD137 человека и антитела против PD-L1 человека вводят в комбинации с одним или большим количеством химиотерапевтических агентов.

По доверенности