

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290920 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.31

(22) Дата подачи заявки
2020.09.11

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TNFR2 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/901,364; 62/985,509; 63/047,824;
63/058,016

(32) 2019.09.17; 2020.03.05; 2020.07.02;
2020.07.29

(33) US

(86) PCT/US2020/050515

(87) WO 2021/055253 2021.03.25

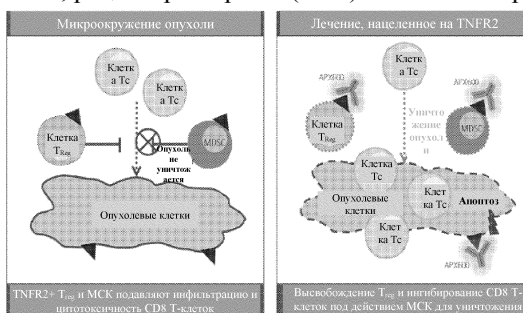
(88) 2021.04.29

(71) Заявитель:
АПЕКСИДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Филберт Эрин Л., Кришнан Сушма,
Тан Кристин, Бахджат Рена, Ян
Сяодун, Альвараро Райан (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены антитела к рецептору 2 фактора некроза опухоли (TNFR2) и родственные композиции, которые можно применять в любом из ряда терапевтических или диагностических способов, включая лечение или диагностику онкологических заболеваний, воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний и т.п. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу не связывает TNFR1, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD40, рецептор смерти 6 (DR6) и/или остеопротегерин (OPG).



A1

202290920

202290920

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573556EA/085

АНТИТЕЛА К TNFR2 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с § 119(e) раздела 35 Свода законов США на основании предварительной заявки на патент США №62/901364, поданной 17 сентября 2019 года; предварительной заявки на патент США №62/985509, поданной 5 марта 2020 года; предварительной заявки на патент США №63/047824, поданной 2 июля 2020 года, и предварительной заявки на патент США №63/058016, поданной 29 июля 2020 года, содержание каждой из которых включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки.

Заявление в отношении перечня последовательностей

Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате вместо его бумажной копии, и его содержание включено в настоящее описание посредством ссылки. Название текстового документа, содержащего указанный перечень последовательностей, - APEX-025/04WO_ST25.txt. Размер документа составляет примерно 265 Кб, документ создан 11 сентября 2020 г. и подан электронным образом посредством EFS-Web.

Уровень техники

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам к рецептору 2 фактора некроза опухоли (TNFR2) и родственным композициям, которые можно применять в любом из множества терапевтических или диагностических способов, включая лечение или диагностику онкологических заболеваний, воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний и т.д.

Описание родственного уровня техники

ФНО- α является незаменимым медиатором воспаления, который играет ключевую роль как при физиологических, так и патологических состояниях. ФНО- α , главным образом, вырабатывается макрофагами и моноцитами и может существовать как в виде связанного с мембраной тримера массой 26 кДа (mTNF- α), так и в виде растворимого тримера массой 17 кДа (sTNF- α). ФНО- α осуществляет свое действие посредством двух рецепторов, TNFR1 (TNFRSF1A; 55 кДа) и TNFR2 (TNFRSF1B; 75 кДа), которые имеют схожие внеклеточные домены, содержащие 4 повторяющихся богатых цистеином мотива, но которые также содержат дивергентные внутриклеточные домены, которые активируют разные сигнальные пути.

TNFR1 представляет собой повсеместно экспрессируемый белок и может активироваться как mTNF- α , так и sTNF- α , для передачи сигнала клетке о выживаемости/воспалении или апоптозе в зависимости от контекста. В противоположность этому, экспрессия TNFR2 регулируется статусом активации и ограничена, главным образом, Т-клетками и иммуносупрессорными миелоидными клетками, также

называемыми миелоидными супрессорными клетками (МСК), которые включают моноклеарные и гранулоцитарные миелоидные клетки. Моноклеарные миелоидные клетки включают терминально дифференцированные макрофаги и дендритные клетки (ДК), а также моноциты, которые в условиях воспаления дифференцируются в тканях в макрофаги и ДК. Гранулоцитарные миелоидные клетки включают популяции терминально дифференцированных полиморфонуклеарных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов и тучных клеток. TNFR2 может в полной мере активироваться только mTNF- α . В отличие от TNFR1, TNFR2 не содержит домен смерти в цитоплазме; вместо этого он может передавать сигнал через TRAF и путь NF κ B для регуляции выживаемости клеток и подавления иммунитета. mTNF также характеризуется обратной передачей сигнала в клетке, в которой он экспрессируется при активации рецептора. Оба TNFR могут расщепляться ферментами TACE и превращаться в растворимые формы, которые могут действовать, снижая восприимчивость клеток к ФНО- α , благодаря удалению рецептора из клетки или действию в качестве «приманки» для sTNF- α .

TNFR2 играет ключевую роль в модуляции иммунной системы, наиболее вероятно посредством воздействия на регуляторные Т-клетки (Treg), которые экспрессируют большое количество TNFR2. У мышей делеция TNFR2 усугубляет аутоиммунное заболевание и колит вследствие снижения функции Treg. У человека известные полиморфные формы TNFRSF1B приводят к снижению экспрессии TNFR2 или снижению связывания с ФНО α и затрудняют опосредованную TNFR2 передачу сигнала в регуляторных Т-клетках. Указанные полиморфные формы сильно коррелируют с аутоиммунными заболеваниями, включая системную красную волчанку (СКВ), болезнь Крона и язвенный колит. Как у мышей, так и у человека TNFR2 экспрессируется в Treg с высокой супрессорной активностью, включая клетки, присутствующие в опухолях, но не экспрессируется в больших количествах в эффекторных Т-клетках. Экспрессия TNFR2 сильно коррелирует с супрессорным микроокружением опухоли при разнообразных типах опухолей. Также, при раке яичников было продемонстрировано, что TNFR2+ Treg могут нарушать Т-эффекторные ответы в МОО (микроокружение опухоли) (Govindaraj С). Мышинные модели предоставили дополнительные доказательства роли TNFR2 в затруднении иммунного ответа на рак. Кроме того, TNFR2 был обнаружен при более чем 25 типах опухолей, включая раковые заболевания почки, толстой кишки и яичника. Мутации TNFR2 с приобретением функции встречаются у пациентов с синдромом Сезари, у которых имеется редкая форма КТКЛ, не поддающаяся лечению.

Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в терапевтических антителах, которые эффективно ингибируют или иным образом действуют в качестве антагониста TNFR2, и в родственных способах лечения рака и воспалительных заболеваний.

Краткое описание

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают рецептор 2 фактора некроза опухоли

(TNFR2), и к способам их применения. Согласно одному из аспектов предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(-ый) связывает TNFR2, включая TNFR2 человека, содержащее(-ий):

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:1-3, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:4-6;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:7-9, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:10-12;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:13-15, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:16-18;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:19-21, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:22-24;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:25-27, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:28-30;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:31-33, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:34-36;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:37-39, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:40-42;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:43-45; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:46-48;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:49-51; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:52-54;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:55-57, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:58-60;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:61-63, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:64-66;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:67-69, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:70-72;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:73-75, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:76-78;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:79-81, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:82-84;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:85-87, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:88-90;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:91-93, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:94-96; или

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:97-99, и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:100-102;

или вариант указанного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменные участки тяжелой и легкой цепей, идентичные переменным областям тяжелой и легкой цепей (i) и (ii) за исключением наличия всего вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен в указанных CDR-областях.

В некоторых вариантах реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133 и 135. В некоторых вариантах реализации область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 134 и 136.

Определенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат:

область VH, представленную в SEQ ID NO:103, и область VL, представленную в SEQ ID NO:104;

область VH, представленную в SEQ ID NO:105, и область VL, представленную в SEQ ID NO:106;

область VH, представленную в SEQ ID NO:107, и область VL, представленную в SEQ ID NO:108;

область VH, представленную в SEQ ID NO:109, и область VL, представленную в SEQ ID NO:110;

область VH, представленную в SEQ ID NO:111, и область VL, представленную в SEQ ID NO:112;

область VH, представленную в SEQ ID NO:113, и область VL, представленную в SEQ ID NO:114;

область VH, представленную в SEQ ID NO:115, и область VL, представленную в SEQ ID NO:116;

область VH, представленную в SEQ ID NO:117, и область VL, представленную в SEQ ID NO:118;

область VH, представленную в SEQ ID NO:119, и область VL, представленную в SEQ ID NO:120;

область VH, представленную в SEQ ID NO:121, и область VL, представленную в SEQ ID NO:122;

область VH, представленную в SEQ ID NO:123, и область VL, представленную в SEQ ID NO:124;

область VH, представленную в SEQ ID NO:125, и область VL, представленную в SEQ ID NO:126;

область VH, представленную в SEQ ID NO:127, и область VL, представленную в SEQ ID NO:128;

область VH, представленную в SEQ ID NO:129, и область VL, представленную в SEQ ID NO:130;

область VH, представленную в SEQ ID NO:131, и область VL, представленную в SEQ ID NO:132;

область VH, представленную в SEQ ID NO:133, и область VL, представленную в SEQ ID NO:134; или

область VH, представленную в SEQ ID NO:135, и область VL, представленную в SEQ ID NO:136.

Некоторые варианты реализации включают выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(-ый) связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, и 135, и соответственно, вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 134, и 136.

Некоторые варианты реализации включают выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(-ый) связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R1**; и, соответственно, вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R2**.

Некоторые варианты реализации включают выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно пункту 6 формулы изобретения, содержащее(-ий) область VH, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из **таблицы R1**, и, соответственно, область VL, которая содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из **таблицы R2**.

Некоторые варианты реализации включают выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(-ый) связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли человека (TNFR2) в эпитопе, который содержит, состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из R21, Y23, T27, S33, K34, T51, и S55, как определено для последовательности зрелого TNFR2 человека (остатки 23-461 FL TNFR2 человека), включая, например, эпитоп, который содержит состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из REY, TAQMCCSK (SEQ ID NO:328) и TVCDS (SEQ ID NO:329). В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:37-39, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:40-42. В некоторых вариантах реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах реализации область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:116. В конкретных вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область VH, представленную в SEQ ID NO:115, и область VL, представленную в SEQ ID NO:116.

В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 человека, например, растворимый и/или экспрессируемый в клетках TNFR2 человека.

В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает по меньшей мере один, два, три, четыре или пять пептидных эпитопов TNFR2 человека, выбранных из **таблицы T1**.

В некоторых вариантах реализации антитело является гуманизированным. В некоторых вариантах реализации антитело выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, scFv, одновалентного антитела, в котором отсутствует шарнирная область, мини-антитела и про-антитела. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой фрагмент Fab или Fab'. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой полное антитело.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит константный домен IgG человека. В некоторых вариантах реализации константный домен IgG содержит домен CH1 IgG1. В некоторых вариантах реализации константный домен IgG содержит Fc-область IgG1, необязательно, модифицированную Fc-область, необязательно модифицированную одной или более аминокислотными заменами.

В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 человека, например, по меньшей мере

один пептидный эпитоп, приведенный в **таблице Т1**, при K_D примерно 2 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 человека при K_D примерно 0,7 нМ или менее или связывает TNFR2 человека в первичных Т-клетках, необязательно T_{reg} , при K_D примерно 50 пМ или менее.

В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одну или более из следующих характеристик:

- (a) ингибирует связывание ФНО- α с TNFR2;
- (b) ингибирует передачу сигнала TNFR2;
- (c) активирует передачу сигнала TNFR2;
- (d) ингибирует тримеризацию TNFR2;
- (e) перекрестно связывает TNFR2 человека и TNFR2 яванского макака;

(f) усиливает/индуцирует уничтожение/истощение опухолевых клеток, T_{reg} и/или супрессорных миелоидных клеток (необязательно макрофагов, нейтрофилов и миелоидных супрессорных клеток (МСК)) посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ);

(g) усиливает/индуцирует уничтожение/истощение опухолевых клеток, T_{reg} и/или супрессорных миелоидных клеток (необязательно макрофагов, нейтрофилов и МСК) посредством опосредованного макрофагами антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ);

(h) снижает подавление иммунной системы миелоидными клетками (необязательно макрофагами, нейтрофилами и МСК);

- (i) превращает МСК и/или макрофаги М2 в провоспалительные макрофаги М1;
- (j) превращает T_{reg} в эффекторные Т-клетки;
- (k) превращает «холодные» опухоли в «горячие» опухоли;
- (l) снижает подавление иммунной системы, опосредованное T_{reg} ; или
- (m) имеет комбинацию любого одного или более из (a)-(k).

В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу не связывает TNFR1, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD40, рецептор смерти 6 (DR6) и/или остеопротегерин (OPG). В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист TNFR2. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой агонист TNFR2. В некоторых вариантах реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело.

Определенные варианты реализации включают выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такие как описано в настоящем документе, вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид, или выделенную клетку-хозяина, содержащую вектор.

Также включена композиция, содержащая физиологически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе.

Также включены способы лечения пациента, страдающего от рака, например, рака, связанного с нарушенной экспрессией TNFR2, включающие введение пациенту композиции, описанной в настоящем документе, для лечения тем самым рака.

Также включены способы лечения пациента, страдающего от рака, например, рака, связанного с опосредованным антагонистом TNFR2 подавлением иммунной системы, включающие введение пациенту композиции, описанной в настоящем документе, для лечения тем самым рака. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист TNFR2.

Также включены способы лечения пациента, страдающего от воспалительного и/или аутоиммунного заболевания, включающие введение пациенту композиции, описанной в настоящем документе, для лечения тем самым воспаления. В некоторых вариантах реализации воспалительное и/или аутоиммунное заболевание связано с нарушенной экспрессией TNFR2, например, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой агонист TNFR2. В некоторых вариантах реализации воспалительное и/или аутоиммунное заболевание связано с опосредованной агонистами TNFR2 активацией иммунной системы.

Краткое описание графических материалов

На **фигуре 1** проиллюстрирован предлагаемый механизм активности антител к TNFR2 при иммунотерапии рака.

На **фигуре 2** проиллюстрирована схема иммунизации и скрининга антитела, описанная в настоящем документе.

На **фигурах 3A-3D** показаны результаты описания характеристик первой группы химерных антител человека. На фигурах 3A-3B меченный His белок TNFR2 человека (3A) или яванского макака (3B) наносили в качестве покрытия в 96-луночные планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C. Промывали планшеты и блокировали 1% БСА. Добавляли антитела в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ), промывали и детектировали антителом к HRP человека. Проявляли исследуемую систему с применением субстрата TMB в течение 3-5 минут. На **фигуре 3C** проводили связывание FACS в клетках CHO, специально созданные с возможностью экспрессии TNFR2 человека. Вкратце, инкубировали антитела совместно с 200000 клеток в буфере MACS в течение 1 часа, затем промывали и детектировали с применением античеловеческого IgG BV421 в течение 20 минут. Анализировали образцы на проточных цитометрах Cytotflex или MACSQuant. На **фигуре 3D** проводили ELISA с блокированием лиганда путем нанесения на планшеты покрытия 1 мкг/мл TNFR-Fc в течение ночи при 4°C. Промывали планшеты, блокировали и инкубировали антитела в течение 1 часа при КТ. Промывали антитела и добавляли 100 нг/мл ФНО-α и инкубировали в течение 1 часа при КТ. Детектировали ФНО-α после промывки мышинным антителом к ФНО-α человека и

антимышиным IgG HRP. Проявляли исследуемую систему с применением субстрата TMB в течение 5-7 минут.

На **фигурах 4A-4D** показаны результаты описания характеристик второй группы химерных антител человека, включая связывание антитела с растворимым (4A) и клеточным (4C) TNFR2 человека, TNFR2 яванского макака (яв.м.) (4B), и блокирования ФНО- α на основе ELISA (4D). Проводили, как описано для фигур 3A-3D выше.

На **фигуре 5** показана передача сигнала TNFR химерными антителами человека в репортерной линии NFkB HEK. Высеивали репортерные клетки HEK TNFR производства Promega в количестве 50000 клеток на лунку в плоскодонный планшет. Добавляли 10 мкг/мл указанных антител или 0,2 нг/мл ФНО- α и инкубировали совместно с клетками при 37°C в течение 20 часов. Детектировали репортерную активность с применением реагента QuantiBlue при отношении 4:1 с надосадочной жидкостью в течение 10 минут. Анализировали планшеты на SpectroMax при 655 нм. Данные показывают, что несмотря на низкий уровень сигнала, 55F6 обладает некоторой активностью агониста, при этом другие антитела не обладают значимой активностью.

На **фигурах 6A-6D** показано связывание гуманизированного антитела с растворимым (6A) и клеточным (6C) TNFR2 человека, TNFR2 яв.м. (6B), и блокирование ФНО- α в ELISA (6D).

На **фигуре 7** показаны результаты клеточного исследования блокирования ФНО- α гуманизированными кандидатами. Высеивали клетки CHO с повышенной экспрессией TNFR2 в количестве 100000 клеток на лунку. Инкубировали клетки совместно с указанными антителами в течение 30 минут во льду. Промывали клетки и добавляли 14 нг/мл биотинилированного ФНО- α в течение 30 минут. Вымывали ФНО- α и детектировали с использованием SA-PE в течение 15 минут. Анализировали клетки на проточном цитометре Cytotflex или MACSQuant. Дважды повторяли исследование.

На **фигуре 8** показаны результаты исследования связывания растворимого TNFR1. Наносили покрытие белка TNFR1, меченного His, в планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Промывали планшеты, блокировали и добавляли антитела в указанных концентрациях в течение 1 часа при КТ. Промывали антитела и детектировали с использованием античеловеческого IgG HRP в течение 1 часа. Проявляли исследуемую систему с применением субстрата TMB в течение 10 минут.

На **фигурах 9A-9B** показана АЗКЦ клеток TNFR2-CHO в исследовании репортера. Использовали набор для биоисследования АЗКЦ ADCC Reporter Bioassay Core производства Promega согласно протоколу производителя. Вкратце, добавляли 25000 клеток TNFR2-CHO добавляли в планшеты с плоскими лунками в буфере для исследования. Добавляли антитела в указанной концентрации. Добавляли по 75000 эффекторных клеток на лунку (Е:Т=3:1). Инкубировали планшеты в течение 6 часов при 37°C. Через 6 часов доводили планшеты до комнатной температуры и детектировали активность репортера с использованием субстрата люциферазы Bio-Glo, уровень которого измеряли через 5 минут на планшет-ридере SpectroMAX. На **фигуре 9A** показана кратность изменения по

сравнению с изотипом, которую вычисляли как ОЕЛ (индуц. - фон)/ОЕЛ (изотипный контроль - фон). На фигуре 9В показаны данные в ОЕЛ, а не кратность изменения.

На **фигурах 10А-10F** показано высокоаффинное одновалентное связывание исследуемых антител в системе Octet [гуманизированные клоны 25-71 (А; $K_{асс}=3,58E+05$ 1/М·с; $K_{дисс}=5,53E-04$ 1/с) и 25-108 (В; $K_{асс}=3,76E+05$ 1/М·с; $K_{дисс}=2,33E-04$ 1/с)] с TNFR2 и связывание с белком TNFR2 человека в ELISA (10С), с белком TNFR2 яванского макака в ELISA (10D), клеточным TNFR2 человека (10Е), в активированных T_{reg} человека (10F).

На **фигурах 11А-11Е** показано, что 25-71 и 25-108 являются специфическими в отношении TNFR2, что показано отсутствием связывания с TNFR1 (11А), медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM; 11В), CD40 (11С), рецептором смерти 6 (DR6; 11D) и остеопротегерином (OPG; 11Е).

На **фигурах 12А-12В** показано уничтожение/истощение клеток, экспрессирующих TNFR2 (12А, трансфектанты), и опухолевых клеток, экспрессирующих TNFR2 (12В, К562, клеточная линия ОМЛ человека), под действием 25-71 и 25-108 посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

На **фигурах 13А-13В** продемонстрировано уничтожение/истощение клеток T_{reg} человека, экспрессирующих TNFR2, исследуемыми антителами посредством механизма АЗКЦ.

На **фигурах 14А-14В** показано уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих TNFR2, под действием 25-71 и 25-108 посредством механизма опосредованного макрофагами антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ).

На **фигурах 15А-15С** показано, что 25-71 и 25-108 могут обращать вспять подавление иммунной системы, опосредованное миелоидными супрессорными клетками (МСК) от двух разных доноров (15В и 15С). Подавление в процентах = только Т - $[(T+МСК)/\text{только Т}] \times 100$.

На **фигуре 16** показаны сайты эпитопов для клона антитела 25-71 и области полноразмерного TNFR2 человека (SEQ ID NO:327), где эпитоп включает остатки 43, 45, 49, 55, 56, 73 и 77 полноразмерного TNFR2.

На **фигурах 17А-17J** показано взаимодействие между клоном антитела 25-71 и TNFR2 человека. Структура 3ALQ PDB TNFR2 окрашена серым цветом в сайтах эпитопов, соответствующих остаткам 43-45 (REY); остаткам 49-56 (TAQMCCSK; SEQ ID NO:328) и остаткам 73-77 (TVCDG; SEQ ID NO:329) полноразмерной последовательности TNFR2 человека. Показаны ленточные изображения/изображения поверхности для вида спереди (А), сзади (В), сбоку 1 (С), сбоку 2 (D) и сверху (Е); и ленточные изображения для вида спереди (F); сзади (G), сбоку 1 (H), сбоку 2 (I) и сверху (J).

На **фигурах 18А-18Е** показано, что клон 25-71 обращает вспять подавление эффекторных Т-клеток под действием T_{reg} . На **18А** очищенные T_{reg} экспрессируют TNFR2 при добавлении систему для исследования подавления. На **18В-18С** представлены данные в виде графика для пролиферации в % Т-респондерных клеток (В) или подавления T_{reg} в

процентах (С). На **фигурах 18D-18E** показаны примеры гистограмм пролиферации для условия отношения Tresp:Treg (D) 1:2 и контроля IgG1 (E).

На **фигурах 19A-19C** показаны противоопухолевые эффекты (48% TGI (подавление роста опухоли)) клона 25-71 у самок бестимусных мышей, которым вводили инъекцию клеток Colo205. На **19A** описан протокол лечения, на **19B** показан эффект исследуемых агентов в отношении объема опухоли, и на **19C** показан эффект в отношении массы тела.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), в частности, к антителам, имеющим специфическую эпитопную специфичность и функциональные свойства. Некоторые варианты реализации включают специфические гуманизированные антитела и их фрагменты, способные связывать TNFR2, блокировать связывание TNFR2 с его лигандом, фактором некроза опухоли- α (ФНО- α), и ингибировать индуцируемую в последующих элементах каскада передачу сигнала в клетках и биологические эффекты. В определенных вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист или ингибитор TNFR2. В некоторых случаях антагонист TNFR2 усиливает иммунные ответы, блокируя иммуносупрессорное действие TNFR2, например, в микроокружении опухоли. Антитела-антагонисты TNFR2, описанные в настоящем документе, подходят для лечения и предотвращения, например, рака, включая формы рака, экспрессирующие TNFR2

Некоторые варианты реализации относятся к применению антител к TNFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов для диагностики, оценки и лечения заболеваний и нарушений, связанных с активностью TNFR2 или его нарушенной экспрессией. Предложенные антитела применяют для лечения или предотвращения рака, помимо прочих заболеваний.

При реализации настоящего изобретения будут применяться, если конкретно не указано иное, традиционные способы вирусологии, иммунологии, микробиологии, молекулярной биологии и методики рекомбинантной ДНК в рамках квалификации специалистов данной области техники, многие из которых описаны ниже для задач иллюстрации. Указанные способы в полной мере объяснены в литературе. См., например, , *Current Protocols in Molecular Biology* или *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(2009); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, 3^e изд., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3^e издание, 2001); Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, тома I и II (D. Glover, ред.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ред., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, ред., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, ред., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ред., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984), и в других схожих источниках.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соотв. англ. артиклям «a», «an» и «the») включают множественное число, если в

тексте иное явным образом не указано.

Под «примерным» понимают количество, уровень, величину, числовое значение, частоту, процентное содержание, измерение, размер, количество, массу или длину, которые отличаются не более чем на 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от указанного количества, уровня, величины, числового значения, частоты, процентного содержания, измерения, размера, количества, массы или длины.

«Антагонист» относится к агенту (например, антителу), который препятствует или иным образом снижает физиологическое действие другого агента или молекулы. В некоторых случаях антагонист специфически связывает другой агент или молекулу. Включены полные и частичные антагонисты.

«Агонист» относится к агенту (например, антителу), которое повышает или усиливает физиологическое действие другого агента или молекулы. В некоторых случаях агонист специфически связывает другой агент или молекулу. Включены полные и частичные агонисты.

Следует понимать, что в настоящем описании, если по контексту не требуется иное, слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий» подразумевает включение указанного элемента или числового значения или группы элементов или числовых значений, но не исключает какой-либо другой элемент или числовое значение или группу элементов или числовых значений.

Под «состоящим из» понимают включающий, и ограниченный элементами, следующими за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, и что не могут присутствовать никакие другие элементы. Под «состоящим по существу из» понимают включающий любые элементы, перечисленные после фразы, и ограниченный другими элементами, которые не препятствуют или не связаны с активностью или действием перечисленных элементов, указанной(-ым) при описании. Таким образом, фраза «состоящий по существу из» указывает на то, что перечисленные элементы являются требуемыми или обязательными, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или не присутствовать в зависимости от возможного их существенного влияния на активность или действие перечисленных элементов.

Каждый вариант реализации в настоящем описании следует применять с соответствующими изменениями к каждому другому варианту реализации, если напрямую не утверждается иное.

Термины «модуляция» и «изменение» включают «увеличение», «усиление» или «стимуляцию», а также «снижение», «уменьшение» или «ингибирование», как правило, в статистически значимом или физиологически значимом количестве или степени по сравнению с контролем. «Увеличенное», «стимулированное» или «повышенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать увеличение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 раз или более (например, в 500, 1000 раз) (включая все числовые значения и

диапазоны между указанными значениями, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.д.) по сравнению с количеством, обеспечиваемым в отсутствие композиции (например, в отсутствие агента) или контрольной композицией. «Сниженное» или «уменьшенное» или «ингибированное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать сниженное на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (включая все числовые значения и диапазоны между указанными значениями) количество, обеспечиваемое в отсутствие композиции (например, в отсутствие агента) или контрольной композицией. Примеры сравнения и «статистически значимых» количеств описаны в настоящем документе.

«По существу» или «значительно» обозначает практически полностью или целиком, например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от некоторого данного количества.

Под «статистически значимым» понимают, что результат с малой вероятностью мог произойти случайно. Статистическая значимость может быть определена любым способом, известным в данной области техники. Обычно используемые показатели значимости включают р-критерий, который представляет собой частоту или вероятность, с которой может происходить наблюдаемое событие, если нулевая гипотеза была верной. Если полученный р-критерий меньше уровня значимости, то в этом случае нулевая гипотеза отвергается. В простых случаях уровень значимости определен как р-критерий 0,05 или менее.

Можно применять стандартные методики рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и выращивания и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментные реакции и методики очистки можно проводить согласно техническими характеристиками производителя или в соответствии с традиционной практикой в данной области техники, или как описано в настоящем документе. Указанные и схожие методики и процедуры, в общем случае, можно проводить согласно традиционным способам, хорошо известным в данной области техники, и как описано в разных общих и более узких справочных материалах, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. Если не предложены конкретные определения, то номенклатура и лабораторные процедуры, и способы, используемые в отношении молекулярной биологии, аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Можно применять стандартные методики рекомбинантной технологии, молекулярной биологии, микробиологии, химического синтеза, химического анализа, получения фармацевтических препаратов, составов и доставки, и лечения пациентов.

В определенных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется наличием или содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности определяющего комплементарность участка V_HCDR1 , V_HCDR2 и V_HCDR3 , и последовательность

вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности определяющего комплементарность участка $V_L\text{CDR1}$, $V_L\text{CDR2}$ и $V_L\text{CDR3}$. Примеры последовательностей $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{CDR2}$, $V_H\text{CDR3}$, $V_L\text{CDR1}$, $V_L\text{CDR2}$ и $V_L\text{CDR3}$ приведены ниже в **таблице Н1**.

Таблица Н1: Последовательности CDR гуманизированного антитела		
CDR	Последовательность	SEQ ID NO:
h600_23_4		
HCDR1	SYTMG	1
HCDR2	FISSSGHTYYANWAKG	2
HCDR3	EGGYGGYDYTGIFNL	3
LCDR1	<u>QATESISSWLA</u>	4
LCDR2	GASTLES	5
LCDR3	QQGYIYTNVDNT	6
h600_23_4_ED		
HCDR1	SYTMG	7
HCDR2	FISSSGHTYYANWAKG	8
HCDR3	<u>DGGYGGYDYTGIFNL</u>	9
LCDR1	QATESISSWLA	10
LCDR2	<u>GASTLES</u>	11
LCDR3	QQGYIYTNVDNT	12
h600_23_24_H		
HCDR1	<u>SYGVN</u>	13
HCDR2	GINTGGSTYYANWAKG	14
HCDR3	TSGNNVYNYFTL	15
LCDR1	QASQSIPSLLA	16
LCDR2	<u>APSTLAS</u>	17
LCDR3	QSYYYGDNTYNNI	18
h600_25_9		
HCDR1	TYDIN	19
HCDR2	IITYTGGITNFANWAKG	20
HCDR3	GGYDSEGYVYPDAFDP	21
LCDR1	QASESISNLLA	22
LCDR2	RASILTS	23
LCDR3	QHGYTGTVNQNV	24

h600_25_37		
HCDR1	NYAMG	25
HCDR2	SRRTDGITYYANWAEG	26
HCDR3	DVGGEGBWYFNL	27
LCDR1	QASQSINIYLA	28
LCDR2	DASKLAS	29
LCDR3	QQGINNIG	30
h600_23_37_ED		
HCDR1	NYAMG	31
HCDR2	SRRTDGITYYANWAEG	32
HCDR3	DVGGDGGWYFNL	33
LCDR1	QASQSINIYLA	34
LCDR2	DASKLAS	35
LCDR3	QQGINNIG	36
h600_25_71		
HCDR1	SYAMG	37
HCDR2	DISTSGNAYYATWVKG	38
HCDR3	ADYGGETYAFDP	39
LCDR1	QASQSISSYLN	40
LCDR2	SASTLAS	41
LCDR3	QQGYSDSNIDNV	42
h600_25_92		
HCDR1	SHHMI	43
HCDR2	IIDAGSGSTYYASWAKG	44
HCDR3	GGLTESLGTYFDL	45
LCDR1	QASESIDSGLA	46
LCDR2	DSSTLAS	47
LCDR3	QSNYDTGSSVYDWGS	48
h600_25_108		
HCDR1	DYFMT	49
HCDR2	IINTGGDSYYATWAKG	50
HCDR3	DTGYGGYDYAGSFDP	51
LCDR1	QASENINSWLA	52
LCDR2	EASKLAS	53

LCDR3	QQGYIYIDVGNI	54
h600_24_2		
HCDR1	VSYWIC	55
HCDR2	CTDGGDGSSYYASWVNG	56
HCDR3	DRSDVFNL	57
LCDR1	QAGQSIDSNLA	58
LCDR2	RASTLAS	59
LCDR3	QSFYVTISAMVDYP	60
h600_24_10		
HCDR1	RYAMA	61
HCDR2	YIDTGDSTYYATWAKG	62
HCDR3	VGVRMYL	63
LCDR1	QASQSISSYLS	64
LCDR2	RASTLES	65
LCDR3	QCGYYGGSYIGA	66
h600_24_124		
HCDR1	SYGIS	67
HCDR2	YIYPDYGSTDYATWVNG	68
HCDR3	GYASSSGYYDPKYFGL	69
LCDR1	RASEDIESYLA	70
LCDR2	DASDLAS	71
LCDR3	QHGFYTSRSDSV	72
h600_24_31		
HCDR1	SYDMS	73
HCDR2	YIWSSGSAYYATWAEG	74
HCDR3	RYVGSSYDT	75
LCDR1	QSSQSVSSNNYLS	76
LCDR2	AASYLAS	77
LCDR3	LGDYDNDIDHA	78
h600_24_103		
HCDR1	SYAMG	79
HCDR2	FIDTGGSTYYANWAKG	80
HCDR3	VGARMYL	81
LCDR1	QASQSI SNLLA	82

LCDR2	RASTLES	83
LCDR3	QCSYYGGSYIGA	84
h600_HB_11D7.1		
HCDR1	RYYMS	85
HCDR2	YIDPIFGNTYYASWVNG	86
HCDR3	DGDAGYDGYGYGTDL	87
LCDR1	QASENIYSGLA	88
LCDR2	SAFTLAS	89
LCDR3	QTYYYGSVTYFNA	90
h600_HB_28B7.3		
HCDR1	SHYMI	91
HCDR2	IITSSDYIYYARWAKGR	92
HCDR3	YNYDDDGELFNL	93
LCDR1	QSSQSIDANNDLA	94
LCDR2	LASKLAS	95
LCDR3	LGGYDDDADNT	96
h600_HB_55F6.6		
HCDR1	NNYYMC	97
HCDR2	CIYPSIVGPTYANWAKG	98
HCDR3	DRYDDYGDYFNL	99
LCDR1	QASQSIYNYLS	100
LCDR2	YASTLAS	101
LCDR3	QNSGVNGNRYGNA	102

Таким образом, в определенных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 и содержит:

последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности определяющего комплементарность участка $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{CDR2}$ и $V_H\text{CDR3}$, выбранные из **таблицы Н1**; и

последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности определяющего комплементарность участка $V_L\text{CDR1}$, $V_L\text{CDR2}$ и $V_L\text{CDR3}$, выбранные из **таблицы Н1**,

включая их варианты, которые специфически связывают по меньшей мере один полипептид или эпитоп TNFR2 (выбранный, например, из **таблицы Т1**).

В определенных вариантах реализации последовательности CDR являются такими, как показано далее:

вариабельная область тяжелой цепи (V_H), содержащая участки $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{CDR2}$

область VH, содержащая участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные,

соответственно, в SEQ ID NO:79-81; и область VL, содержащая участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:82-84;

область VH, содержащая участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:85-87; и область VL, содержащая участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:88-90;

область VH, содержащая участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:91-93; и область VL, содержащая участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:94-96; или

область VH, содержащая участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:97-99; и область VL, содержащая участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:100-102.

Также включены их варианты, включая варианты с созревшей аффинностью, которые связывают TNFR2, например, варианты, имеющие всего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изменений в участках CDR, например, в одной или более последовательностях V_HCDR1, V_HCDR2, V_HCDR3, V_LCDR1, V_LCDR2 и/или V_LCDR3, описанных в настоящем документе. Примеры «изменений» включают аминокислотные замены, вставки и делеции.

В определенных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется наличием или содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L). Примеры гуманизированных последовательностей V_H и V_L приведены ниже в **таблице Н2**, примеры последовательностей V_H кролика приведены ниже в **таблице R1** (подчеркнуты участки V_HCDR1, V_HCDR2 и V_HCDR3), и примеры последовательностей V_L кролика приведены ниже в **таблице R2** (подчеркнуты участки V_LCDR1, V_LCDR2 и V_LCDR3).

Таблица Н2: Гуманизированные последовательности тяжелой и легкой цепей		
Название	Последовательность (CDR подчеркнуты)	SEQ ID NO:
HC h600_23_4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSYTMGWV RQAPGKGLEWVGFISSSGHTYYANWAKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGYGGYDYTGIF NLWGQGTLVTVSS	103
LC h600_23_4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQATESISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQGGYIYTNVDNTFGGGTKVEIK	104
HC h600_23_4_ED	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSSYTMGWV RQAPGKGLEWVGFISSSGHTYYANWAKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYGGYDYTGIF NLWGQGTLVTVSS	105
LC	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQATESISSWLAWYQQ	106

h600_23_4_ED	KPGKAPKLLIY <u>GASTLES</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYYC <u>QQGYIYTNVDNT</u> FGGGTKVEIK	
HC h600_23_24_H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>SYGVN</u> WV RQAPGKGLEWVG <u>INTGGSTYYANWAKGRFTISRDNS</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCART <u>SGNNVYNYFTLW</u> GQGTLVTVSS	107
LC h600_23_24_H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQSIP</u> SLLA <u>WYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>APSTLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYC <u>QSYYYGDNTYNNIF</u> FGGGTKVEIK	108
HC h600_25_9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>TYDIN</u> WVR QAPGKGLEWVG <u>IITGGITNFANWAKGRFTISRDNSKN</u> TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYDSEGYVYPDAFD PWGQGTLLVTVSS	109
LC h600_25_9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASESISN</u> LLA <u>WYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>RASILT</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYC <u>QHGYTG</u> TNVQNVFGGGTKVEIK	110
HC h600_25_37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLS <u>NYAMGWV</u> RQAPGKGLEWVG <u>SRRTDGITYYANWAEGRFTISRDNS</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRD <u>VGGEGGWYFNL</u> WGQGTLLVTVSS	111
LC h600_25_37	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>QASQSINI</u> YLA <u>WYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>DASKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYC <u>QQGINNIG</u> FGGGTKVEIK	112
HC h600_23_37_E D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLS <u>NYAMGWV</u> RQAPGKGLEWVG <u>SRRTDGITYYANWAEGRFTISRDNS</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGRD <u>VGGDGGWYFNL</u> WGQGTLLVTVSS	113
LC h600_23_37_E D	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>QASQSINI</u> YLA <u>WYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>DASKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYC <u>QQGINNIG</u> FGGGTKVEIK	114
HC h600_25_71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLS <u>SYAMGWV</u> RQAPGKGLEWVG <u>DISTSGNAYYATWVKGRFTISRDNS</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>ADYGGETYAFDPW</u> GQGTLVTVSS	115

LC h600_25_71	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQSISSYLNWYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>SASTLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QQGYSDSNIDNV</u> FGGGTKVEIK	116
HC h600_25_92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>SHHMIWVR</u> QAPGKGLEWVG <u>IIDAGSGSTYYASWAKGRFTISRDNSK</u> NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>GLTESLGT</u> YFDLW GQGTLVTVSS	117
LC h600_25_92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASESIDSGLAWYQQ</u> KPGKAPKLLIY <u>DSSTLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ QPEDFATYYC <u>QSNYDTGSSVYDWGS</u> FGGGTKVEIK	118
HC h600_25_108	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>SDYFMTWV</u> RQAPGKGLEWVG <u>IINTGGDSYYATWAKGRFTISRDNS</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>TGYGGYDYAGSF</u> <u>DPWG</u> QGTLVTVSS	119
LC h600_25_108	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC <u>QASENINSWLAWYQQ</u> KPGKAPKLLIY <u>EASKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ QPEDFATYYC <u>QQGYIYIDVGNIF</u> FGGGTKVEIK	120
HC h600_24_2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSV <u>SYWICWV</u> RQAPGKGLEWV <u>ACTDGGDGSSYYASWVN</u> GRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>RSDFNL</u> WGQ GTLVTVSS	121
LC h600_24_2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QAGQSIDSNLAWYQQ</u> KPGKAPKLLIY <u>RASTLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ QPEDFATYYC <u>QSFYVTISAMVDY</u> PFGGGTKVEIK	122
HC h600_24_10	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLS <u>RYAMAWV</u> RQAPGKGLEWVG <u>YIDTGDSTYYATWAKGRFTISRDN</u> KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTN <u>VGV</u> RMYLWGQGT LTVSS	123
LC h600_24_10	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQSISSYLSWYQQK</u> PGKAPKLLIY <u>RASTLES</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QCGYYGGSYIGA</u> FGGGTKVEIK	124
HC h600_24_124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSY <u>GISWVR</u> QAPGKGLEWVAYIY <u>PDYGSTDYATWVN</u> GRFTISLDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGY <u>ASSSGYYDPKYF</u>	125

	<u>GLWGQGT</u> LVTVSS	
LC h600_24_124	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASEDIESYLA</u> WYQQ KPGKAPKLLIYD <u>ASDLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQHGFYTSRSDSVFGGGTKVEIK	126
HC h600_24_31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>SYDMS</u> WV RQAPGKGLEWVG <u>YIWSSGSAYYATWA</u> EGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>CARRYVGSSYDTW</u> GQG TLTVSS	127
LC h600_24_31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>QSSQSVSSNNYL</u> SWY QQKPGKAPKLLIY <u>AASYLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYC <u>LGDYDNDIDHAF</u> GGGGTKVEIK	128
HC h600_24_103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLS <u>SYAMG</u> WV RQAPGKGLEWVG <u>FIDTGGSTYYANWAK</u> GRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ANVGARMYL</u> WGQGT LTVSS	129
LC h600_24_103	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>QASQISISNLLA</u> WYQQ KPGKAPKLLIY <u>RASTLES</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQCSYYGGSYIGAFGGGGTKVEIK	130
HC h600_HB_11D7 .1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD <u>FSRYYM</u> SWV RQAPGKGLEWVG <u>YIDPIFGNTYYASWVN</u> GRFTISSDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARDGDAGYDGYGYGT</u> <u>DLWGQGT</u> LVTVSS	131
LC h600_HB_11D7 .1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>QASENIYSGLA</u> WYQQ KPGKVPKLLIV <u>SAFTLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDVATYYCQTYYYGSVTYFNAFGGGGTKVEIK	132
HC h600_HB_28B7 .3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLS <u>NSHYMI</u> WV RQAPGKGLEWVG <u>ITSSDIYYARWA</u> KGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARYNYDDDGE</u> LFLNLWG QGTLTVSS	133
LC h600_HB_28B7 .3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>QSSQSIDANNDLA</u> WY QQKPGKAPKLLIY <u>LASKLAS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYC <u>LGGYDDDADNTF</u> GGGGTKVEIK	134
HC h600_HB_55F6.	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFT <u>NNYYMC</u> W VRQAPGKGLEWVG <u>CIYPSIVGPTY</u> YANWAKGRFTISRD	135

6	NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR <u>DRYDDYGDYFN</u> <u>L</u> WGQGTLLTVSS	
LC h600_HB_55F6. 6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIYNYLSWYQQ KPGKAPKRLIYYASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQNSGVNGNRYGNAFGGGTKVEIK	136
Таблица R1. Примеры последовательностей тяжелой цепи антитела кролика (HCDR 1-3 подчеркнуты)		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
rab600_24_2	QEQL EESGGGLVQPEGSLALTCKASGFSFSVSYWI <u>C</u> WVRQAPGKGLEWIACTDGGDGSSYYASWVNG RFTISKISSTTVTLQMTSLTAADTAIFYCARD <u>RSDV</u> <u>FNL</u> WGPGTLTVSS	137
rab600_24_25	QSLEESGGGLVKPEGSLTLTCAVSGFDLNSYYWI <u>C</u> WARQAPGKGLEWIA <u>C</u> IDGGSTGSAYYASWAKG RLSISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARVQSY <u>VGYANYGYPNYFNL</u> WGPGTLTVSS	138
rab600_24_62	QSLEESGGDLVVPGTSLTLTCTASGFDLSSFYYMC WVRQAPGKGLEWIA <u>C</u> IYAVSSGSTYYASWAKGR FTVSRSTSSTATLQMTSLTAADTATYFCAR <u>HQSY</u> <u>ETYG</u> VGVVYATYFSLWGPGTLTVSS	139
rab600_24_97	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCKASGFSFS <u>SGHDM</u> <u>C</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>C</u> IYDPDYDITDYASWVNGR FTISLDNAQNTVFLQMTSLTAADTATYFCAR <u>SGY</u> <u>GGFRYGFNL</u> WGPGTLTVSS	140
rab600_24_124	QEQLVESGGGLVTLGGSLKLSCASGIDFSSYGIS WVRQAPGKGLEWIA <u>Y</u> IYDPDYGSTDYATWVNGRF TISLDNAQNTVFLQMTSLTAADTATYFCAS <u>GYAS</u> <u>SSGY</u> DPKYFGLWGPGTLTVSS	141
rab600_25_10	QSVEESGGRLVAPGTPLTLTCTVSGIDLSRYAMA WVRQAPGKGLEYIGYIDTGDSTYYATWAKGRFTI SRTSTTVHLKIASPTTEDTATYFCTNV <u>GVRMYLW</u> GPGTLTVSS	142
rab600_25_20	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCIVSGIDLSRYAMGW	143

	VRQAPGKGLEYG <u>FIDTAGSTYYANWAKGRFTIS</u> KTSTTVDLKIASPTTEDTATYFCAN <u>VGARMYLW</u> GPGTLVTVSS	
rab600_25_31	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTASGFSLSS <u>YDMS</u> WVRQAPGKGLEWIGYIWSSGSAYYATWAEGRFT ISKSTTVGLKITSPTTEDTATYFCARRY <u>VGSSYD</u> TWGQGTTLVTVSS	144
rab600_25_103	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSS <u>YAM</u> <u>GW</u> VVRQAPGKGLEYG <u>FIDTGGSTYYANWAKGRF</u> TISRTSTTVDLKIASPTTEDAATYFCAN <u>VGARMYL</u> WGPGTLVTVSS	145
rab600_23_7H2.5	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSN <u>YYMN</u> WVRQAPGKGLEWIGIITDSGTTYASWVKGRFTI SKTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARE <u>PDYDGYA</u> <u>GYGYGDLWGQGTTLVTVSS</u>	146
rab600_23_8G10.7	QQLEQSGGGAGGGLVKPGGSLELCKASGFTLIN <u>SHWICWVRQAPGKGLEWIGCIFAGSAGSTYYAT</u> <u>WVSGRFTLSRDIDQNTGCLQLNSLTAADTAMYY</u> <u>CARDQNTAYDPFYLN</u> LWGQGTTLVTVSS	147
rab600_23_8G11.5	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNS <u>NGMN</u> WVRQAPGKGLEWIGGINAGGSAYYANWAKGRF TISKSTMVDLKITSPTTEDTATYFCAKTSGIN <u>VY</u> <u>NYLN</u> LWGQGTTLVTVSS	148
rab600_23_9B11.2	QQQLVESGGGLVKPGASLTLTCKASGFSFS <u>NTTY</u> <u>MCWVRQAPGKGLEWIA</u> CIEAGDSES <u>NYYASWAK</u> <u>GRFTISKASSTTVTLQMTTLTAADTATYFCARAT</u> <u>YDTFGYGDYVYTTPASFNLWGPGTLVTVSS</u>	149
rab600_23_11D7.1	QEQLKESGGGLVQPGGSLKLSCASGFDFS <u>RYYM</u> <u>SWVRQAPGKGLEWIGYIDPIFGNTYYASWVNGRF</u> TISSHNAQNTLYLQLNNLTAADTATYFCARD <u>GDA</u> <u>GYDGYGYGTDLWGPGTLVTVSS</u>	150
rab600_23_11G12.1	QSLEESGGDLVQPGASLTLTCTASGFSVN <u>VNSYM</u> <u>CWVRQAPGKGLELIACIDTGSGGSTWYG</u> SWAKG RFTISKSTNLNTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>AR</u>	151

	<u>NTYGYGDYVYGGAFDPWGPGTLVTVSS</u>	
rab600_23_28B7.3	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLN <u>SHYMIW</u> VRQAPGKGGLEYIG <u>IITSSDIYYARWAKGRFTISK</u> TSSTTVDLKITSPTTEDTATYSCARY <u>NYDDDGELF</u> <u>NLWGQGTLVTVSS</u>	152
rab600_23_37D1.4	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLN <u>SNGMN</u> WVRQAPGKGLEWIGGINAGGSAYYANWAKGRF TISK TSTMVDLKITSPTTEDTATYFCAK <u>TSGINVY</u> <u>NYLNLWGQGTLVTVSS</u>	153
rab600_23_37H4.1	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLN <u>SHYMIW</u> VRQAPGKGGLEYIG <u>VITSSDIYYARWAKGRFTISK</u> TSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARY <u>NYDDDGELF</u> <u>NLWGQGTLVTVSS</u>	154
rab600_23_55F6.6	QQQLEESGGDLVKPGASLTVTCTASGFSFT <u>NNYY</u> <u>MCWVRQAPGKGLEWIGCIYPSIVGPTYANWAK</u> <u>GRFTISKTSSTTVTLEMTSLTAADTATYFCVRDRY</u> <u>DDYGDYFNLWGPGTLVTVSS</u>	155
rab600_23_4	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDL <u>SSYTMG</u> WVRQAPGKGGLEYIG <u>FISSSGHTYYANWAKGRFTI</u> SKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARD <u>GGYGGY</u> <u>DYTGIFNLWGQGTLVTVSS</u>	156
rab600_23_5	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSL <u>STYGVSW</u> VRQAPGKGLDWIG <u>IIDSSGSTWYTSWVKGRFTIS</u> KTSTTVDLKVTSPPTEDTATYFCARE <u>SYHSNFW</u> GQGTLVTVSS	157
rab600_23_6	QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSL <u>SSYYVS</u> WVRQAPGKGLEWIG <u>IIHSDGSIYYATWAKGLFTIS</u> RTSTTVDLKATSLTTEDTATYFCVRGYPGYTST <u>FNRLDLWGQGTLVTVSS</u>	158
rab600_23_8	QSLEESGGDLVQPEGSLTLTCTASGFSFSS <u>SYIIC</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIYAGSSGSTYYASWAKGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARD <u>VGSG</u> <u>YYPDVFNFWGPGTLVTVSS</u>	159
rab600_23_21	QEQLKESRGGLVKPGGSLELCKASGFTL <u>SSHWI</u>	160

	<u>CWVRQAPGKGLEWIGCIHAGSSGSAYYASWVNG</u> RFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTADTAMYYCARDQ <u>TATTYDPYYLNLWGQGTLVTVSS</u>	
rab600_23_24	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYGVN WVRQAPGKGLEWIGGINTGGSTYYANWAKGRFT ISKTSAMVDLKVTSPTTEDTATYVCARTSGNNVY <u>NYFTLWGQGTLVTVSS</u>	161
rab600_23_33	QSVEVSGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLTTYMI WVRQAPGKGLEYIGIITSSGSTYYASWAKGRFTIS KTSTSVDLKVTSPTTEDTATYFCARYTYDDDGE <u>FNLWGQGTLVTVSS</u>	162
rab600_23_45	QSLEESGGGLVKPEGSLTLTCKASGFDLSSYYMC WVRQAPGKGLELIACIYDGSSVSTYYASWAKGRF TMSKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARDNLRH <u>AGYGQPFNLWGPGTLVTVSS</u>	163
rab600_23_50	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGSSFSNSYYM <u>CWVRQAPGKGLEWIGCIYTGSGSTYYANWAKGR</u> FTISETSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARYDAAY <u>AGDGYTIGNAFDPWGPGTLVTVSS</u>	164
rab600_23_52	QEQLVESGGGLVQPEGSLSLTCTASGFTLNNYCM <u>CWVRQAPGKALEWIAAAGSSGTPYYASWAKG</u> RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARIYYS <u>YGYGDVAYGAEDPWGPGTLVTVSS</u>	165
rab600_23_53	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYYMIW VRQAPGKGLEWIGIITSSGSTYYASWAKGRFTISK TSSTTVDLKITSPTTEDTATHFCARYSYNDDEFF <u>NLWGQGTLVTVSS</u>	166
rab600_23_57	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMG WVRQAPGKGLEWIGIIGSGGNTYYATWAKGRFTI SRTSTTVDLRITSPTTEDTATYFCARDVGYGDYD <u>ALDLWGQGTLVTVSS</u>	167
rab600_23_62	QEQLKESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFDFSSHYM <u>SWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGNTYYANWVNGR</u> FTISSHNAQNTLYLQLNSLTVADTATYFCARDGE	168

	<u>AGYAGYGYGTDLWGPGLTVTVSS</u>	
rab600_23_70	QSLEESGGDLVKPEGLTLTCTASGFSFS <u>SAGYWIY</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIGNGDDDDTYANWAKGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCATDIHGG <u>NSLDLWGPGLTVTVSS</u>	169
rab600_23_71	QSVEESGGRLVTPGTSLTLCTVSGIDLSSYAMSW VRQAQKGLEWIGI <u>IGDSGSTWYASWAKGRFTIS</u> KTSTTVDLKITSPTPEDTATYFCAREPDYGGYAG <u>YGYGDLWGQGLTVTVSS</u>	170
rab600_23_75	QEQLKESGGGLVQPGSLKLSCASGFDFSHYY <u>MSWVRQAPGKGLEWIGYIDPVFGNTYYANWVN</u> <u>GRFTISSHNAQNTLYLQLNSLTVADTATYFCARD</u> <u>GEAGYAGYGYGTDLWGPGLTVTVSS</u>	171
rab600_23_79	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLNSYYMIW VRQAPGKGLEWIGIITSSGYTYYASWAKGRFTISK TSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARYSYDDDGELF <u>NLWGQGLTVTVSS</u>	172
rab600_23_80	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSNYYYM <u>CWVRQAPGKGLEWIACIYDGDGSTYYATWAKG</u> RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARTYYT <u>YGYNVDAADAALNLWGPGLTVTVSS</u>	173
rab600_23_81	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSNYYVSW VRQAPGKGLEWIGI <u>IETGGNLYYASWAKGRFSL</u> KTSTTVDLKITSPTAEDTATYFCVRGYPGYYTHTF <u>NRLDLWGQGLTVTVSS</u>	174
rab600_23_82	QEQLLEESGGDLVKPGGLTLTCTASGIDFSSYYY <u>MCWVRQAPGKGLEWIACIYSGSSNSTYYANWAK</u> <u>GRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARDH</u> <u>YAYGYAGVAYGTEYNLWGPGLTVTVSS</u>	175
rab600_23_85	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCKASGFSFSTYWMC WVRQAPGKGPEWIA <u>CIAAGSSDTPYYANWAQGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCARIAYSY <u>GYGDYGYGAFDPWGPGLTVTVSS</u>	176
rab600_23_90	QEQLQSGGGAGRGLVKPGGSLELCCNASGFTLS	177

	<u>NSYWICWVRQAPGKGLEWIGC</u> <u>IFAGSAGSAYYA</u> <u>TWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTAMY</u> <u>YCARDQSSTAYDPFYFNSWGQGTLVTVSS</u>	
rab600_23_102	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLS <u>TYDMIW</u> VRQAPGKGLEWIGYI <u>WSDGITDYASWAKGRFTIS</u> KTSTTVDLKVTSPPTEDTATYFCARD <u>VGYAGYG</u> <u>YYFDLWGQGTLVTVSS</u>	178
rab600_23_105	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSS <u>SYMC</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIYVGSIGSTYYASWAKGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARD <u>YYTY</u> <u>DYGDYAYGTRLDLWGQGTLVTVSS</u>	179
rab600_23_106	QQQLVESGGDLVKPGASLTLTCKASGIDFSS <u>SGYD</u> <u>MCWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CFDAASSDTTYASWA</u> <u>KGRFTISRTSSTTVTLQATSLTVADTATYFCATIG</u> <u>YDAAGDWKYAFDPWGPGLVTVSS</u>	180
rab600_23_107	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSS <u>NAISW</u> VRQAPGKGLEWIGI <u>INTYDNTAYATWAKGRFSIS</u> RTSTTVDLKITSPATKDTATYFCARD <u>VHNNVVPY</u> <u>YFDMWGQGTLVTVSS</u>	181
rab600_23_108	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSG <u>SYYM</u> <u>YWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIYNGDGSTYYASWAKG</u> RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCART <u>YTS</u> <u>YGYNVDADAALNLWGPGTLVTVSS</u>	182
rab600_23_110	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLRS <u>YNICW</u> VRQAPGKGLEWVGL <u>IGPAGNAYYASWAKGHFTL</u> SKTSTTVDLIITSPTTEDTATYFCSRD <u>ATIEGMSLW</u> GPGTLVTVSS	183
rab600_23_114	QEQLVESGGGLVQPGGSLKLSCKASGFDFSG <u>GHYM</u> <u>SWVRQAPGKGLEWIGY</u> <u>FDPIFHSTYYASWVNGR</u> FTISSHSAQNTLYLQLNSLTAADTATYFCARD <u>G</u> <u>N</u> <u>AGYDGYGYGTDLWGPGTLVTVSS</u>	184
rab600_23_119	QEQLVESGGDLVKPEGSLTLTCTVSGFSFSS <u>SYWI</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIYAGSSGSTAYANWAKA</u> RFTISKTSSTTTVALQMTSLTVADTATYFCARG <u>IYV</u>	185

	<u>GYGGNGYADLWGPGLTVTVSS</u>	
rab600_23_123	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSS <u>GYDM</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIYTGDGSTYYASWAKGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARD <u>IGSD</u> <u>YYAFFNLWGPGLTVTVSS</u>	186
rab600_23_127	QEQLLEESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFDFSV <u>NAM</u> <u>CWVRQAPGKGPEWIA</u> <u>YISNADGSTHYASWVNGR</u> FTISRSTSLNTVTLQMTRLTVSDTATYFCAR <u>APYA</u> <u>GYTGYGYLNLWGPGLTVTVSS</u>	187
rab600_23_129	QSLEESGGGLVQPEGPLTLTCTASGFSFSSTYY <u>MC</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIDAGSSTNTYYASWAKGR</u> FTISKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCAR <u>ASYAT</u> <u>YGYGDYIATAPQFFNLWGPGLTVTVSS</u>	188
rab600_23_130	QSLEESGGDLVKPGASLTFTCTASGFSFSGIDY <u>MC</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIYGGDGGITYYASWAKGR</u> FTISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>VGSRY</u> <u>TGYPNYDDVPEHFKLWGPGLTVTVSS</u>	189
rab600_23_132	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSSSYW <u>IC</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>CIYGGSGYNIYYASWAKGR</u> FTISKTSPTTVTLQMTSLTGADTATYFCAR <u>GIGVG</u> <u>YGGNGYADLWGPGLTVTVSS</u>	190
rab600_23_133	QSLEESGGDLVKPGGTLTLTCKASGIDFSSYY <u>DM</u> <u>CWVRQAPGKGLELIA</u> <u>CIYTSSGSTYYASWAKGRF</u> TISKTSSTTVDLKMTSLTAADTATYFCARD <u>SGYA</u> <u>GYGYYFSLWGPGLTVTVSS</u>	191
rab600_23_135	QSLEESGGGLVQPEGSLTLTCKASGFSFSSGY <u>DM</u> <u>CWVRQAPGKGLECIA</u> <u>CIYTGdstTWYASWAKGR</u> FTISRPSSTAVTLQMTSLTAADTATYFCARD <u>RDA</u> <u>GYGYTYFNLWGPGLTVTVSS</u>	192
rab600_23_140	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCKASGFSFSSGY <u>VM</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIA</u> <u>CIDTSSGTTWYATWVNGR</u> FTISRSTSLNTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>AGYI</u> <u>NYSYTSDFDLWGPGLTVTVSS</u>	193
rab600_23_141	QEQLVESGGGLVTLGGSLKLSCKASGIDFSSY <u>GIS</u>	194

	WVRQAPGKGLEWIA <u>TIDPDYGNTDYASWVNGRF</u> TISLDNAQNTVYLQMTSLTAADTATYFCTRIS <u>SFAS</u> <u>SSGYYS</u> PFNLWGPGTLVTVSS	
rab600_23_148	QEQLVESGGGLVTLGGSLKLSCKASGFD <u>PSSYGS</u> <u>SWVRQAPGKGLEWIA</u> YIYDPDYGITDYASWVNGR FTISLDKAQNTVFLQMTSLTAADTATYFCASD <u>VG</u> YAGYAYDRGYFNLWGPGTLVTVSS	195
rab600_23_152	QEQLVESGGGLVTLGGSLKLSCKASGIDFS <u>NYGFS</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>YIDPDYGYTDYASWVNGRF</u> TISLDNAQNTVFLQMTSLTAADTATYFCTR <u>DHYT</u> YGDAGYADATSAFD <u>PWGPGTLVTVSS</u>	196
rab600_23_153	QEQLVESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFSFSS <u>SYWI</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIG</u> CIYTGSSGSTYYASWAKG RFTITKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>ASGG</u> <u>SSVYMNF</u> FTLWGPGTLVTVSS	197
rab600_23_158	QSLEESGGDLVQPEGSLTLTCTASGFSFSS <u>NYDMC</u> WVRQAPGKGPEWIA <u>CIYTGDDSTYYASWAKGRF</u> TISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>DIGSDY</u> YAFFNLWGPGTLVTVSS	198
rab600_23_163	LSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSYSGSYWIC WVRQAAGKGLEWVACIYAGSSGNPYYASWAKG RFTISRASSTAVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>DDY</u> <u>TTDGAGYAYG</u> TRLDLWGQGTLVTVSS	199
rab600_23_165	QQQLEESGGGLVTLGGSLKLSCKASGIDFS <u>SFGIT</u> WVRQAPGKGLEWIA <u>YIDPDYGT</u> TDYASWVNGRF TISLDNAQNTVFLQLTSLTAADTATYFCAR <u>ALYTS</u> <u>GAAGYADATGA</u> FD <u>PWGPGTLVTVSS</u>	200
rab600_23_167	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCKASGFSFSS <u>SGYDM</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIA</u> CIYTGDGSTYYASWAKGR FTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>DIGSD</u> <u>YYAFFNL</u> WGPGTLVTVSS	201
rab600_23_177	QEQLVESGGDLVKPGASLTLTCTAAGFTIST <u>TYWI</u> <u>CWVRQAPGKGLEWIA</u> CIYGNGGGTWYASWAKG RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR <u>LLNS</u>	202

	<u>YVDFNL</u> WGPGTLVTVSS	
rab600_23_182	QSLEDSSGGDLVKPGASLTLSCTASGFDFSGYYMC WVRQAPGKGLEWIIACIGIGSGSAYYANWAKGRF TISEASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCGRDRDGG <u>SMSYDL</u> WGPGTLVTVSS	203
rab600_25_9	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYDINW VRQAPGKGLEWIGIIYTGGITNFANWAKGRFTISK TSTTVDLKIASPTTEDTATYFCARGGYDSGDYVY <u>PDAFDP</u> WGPGTLVTVSS	204
rab600_25_14	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYDMIW VRQAPGEGLEWIGSAAAYDGGAYYASWAKGRFTI SKTSSTTVDLKMTSPTTEDTATYFCARGGYNDAL <u>SL</u> WGQGTTLVTVSS	205
rab600_25_26	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMG WFRQAPGEGLEWIGSMRTDGGTYANWAEGRF TISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRDVGGDGG <u>WYFNL</u> WGPGTLVTVSS	206
rab600_25_37	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTYAMG WFRQAPGEGLEWIGSRRTDGITYANWAEGRFTI SRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRDVGGDGGW <u>YFNL</u> WGPGTLVTVSS	207
rab600_25_38	QSVEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGFSLSSYNMQ WVRQSPGKGLEWIGIMTIDAGPYAAAWAKGRFTI SKTSSTTVDLKMTGLTTEDTATYFCARGFFGLWG PGTLVTVSS	208
rab600_25_42	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTYAMIW VRQAPGKGLEWIGFIRPGGSAWYASWAKGRFTIS KTSTTVDRITSPTTEDTATYFCATYDITYGYGDTR <u>L</u> WGPGTLVTVSS	209
rab600_25_43	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMS WVRQAPGKGLEWIGYIWSSGSSYYASWAKGRFT ISKTSSTTVGLKITSPTTEDTATYFCARRYVGSSYV <u>T</u> WGQGTTLVTVSS	210
rab600_25_46	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSSYPMTW	211

	VRQAPGKGLEWIGMIYGSGGAYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKMNSLTASDTATYFCGRGSLWPGGT LVTVSS	
rab600_25_48	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMSW VRQAPGKGLEWIGYIYNDSGSTFYATWARGRFTI SGSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARWDSYGYG DENLWPGGTLVTVSS	212
rab600_25_51	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMG WVRQAPVKGLKWIGFIDVDGSAYYATWAKGRFT ISKTSTTVDLKITSPTTEDSATYFWTRYDNYGYGD ENLWPGGTLVTVSS	213
rab600_25_54	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTASGFSLSTYDMS WVRQAPGKGLEWIGYIWSSGSAYYATWAQGRFT ISKTSTTVGLKIASPTTEDTATYFCARRFVGSSYDT WGQGTLVTVSS	214
rab600_25_63	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMS WVRQTPGKGLEWIGYIWSSGSAYYASWAEGRFTI SKTSTTVGLKITSPTTEDTATYFCARRFVGSSYDT WGQGTLVTVSS	215
rab600_25_70	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSHYS WVRQAPGKGLEWIGIITSSGSTYYASWAKGRFTIS KTSPVDLEITSPTTEDTATYFCARDWYDDYGDY RSLWPGGTLVTVSS	216
rab600_25_71	QSVEESEGRVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMG WVRQAPGMGLEWIGDISTSGNAYYATWVKGRFT ISRTSTTVDLKMASLTADTATYFCARADYGGET YAFDPWPGGTLVTVSS	217
rab600_25_75	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSSYPMTW VRQAPGKGLEWIGMIYGSGGAYYATWAKGRFTI SKTSTTVDLKMNSLTASDTATYFCGRGSLWPGGT LVTVSS	218
rab600_25_82	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMS WVRQAPGKGLEWIGIYAGSGTTNYATWAKGRF TISKSTTVDLKISSPTTEDTATYFCARGGYDSDA	219

	<u>YVYPDVFDPWGPGLVTVSS</u>	
rab600_25_84	QEQLKESGGGLVTPGTPLTLTCTASGFSLSSYDMS WVRQAPGKGLEWIGYIWSSGSAYYASWAKGRFT ISKSTTTVGLKITSPTTEDTATYFCARRFVGSSYDT WGQGLVTVSS	220
rab600_25_92	QSVEESGGRLVKPDETLTLICTVSGFSLSSHMIW VRQAPGEGLEGIGIIDAGSGSTYYASWAKGRFTIS RTSTTVDLKIASPTTEDTATYFCARGGLTESLGT FDLWGPGLVTVSS	221
rab600_25_93	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFFLSSYEMNW VRQAPGKGLEWIGVIYTDGSAYYASWAKGRFTIS KASTTVDLKVTSPPTTEDTATYFCARGHPDYSSGM VFNLWGQGLVTVSS	222
rab600_25_97	QSLEESGGRLVKPDESLTLTCTASGIDLSSYYMIW VRQAPGKGLEWIGRIDANSNTYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKITSPTTADTATYFCAGDFELWGPGL LTVSS	223
rab600_25_100	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYALGW FRQAPGEGLEWIGSMRTDGVTTYANWAEGRFTIS KTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRDVGGDGGWY FNLWGPGLVTVSS	224
rab600_25_108	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCKASGFSLSDYFMT WVRQAPGKGLEWIGIINTGGDSYYATWAKGRFTI SKTSTTVDLKISSPTTEDTATYFCARDTGYGGYD YAGSFDPWGPGLVTVSS	225
rab600_25_110	QSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSDYYMS WVRQAPGKGLEYIGIINTGGNTYYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKISSPTTEDTATYFCARDTGYGGYD YAGSFDPWGPGLVTVSS	226
rab600_25_111	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNSHVMT WVRQAPGKGLEWIGILTSSGYTTYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAREGYDYDDSG DYPYYFNIWGPGLVTVSS	227
rab600_25_114	QSVAESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSYAMS	228

	WVRQAPGKGLEWIG <u>I</u> IGSRDNTHYASWAKGRFTI SKTSTTVDLKIASPTTEDTATYFCARD <u>I</u> YGGYGDY TYDWL <u>D</u> LWGQGLVTVSS	
Таблица R2. Таблица R1. Примеры последовательностей легкой цепи антитела кролика (LCDR 1-3 подчеркнуты)		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
rab600_24_2	DDIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQAGQSIDSNL <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>R</u> ASTLASGVPSRFKGS GTEFALTISDLECAATAFYCQSFYVTISAMVDYP FGGGTEVVVK	229
rab600_24_25	IEMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQSSSEDIDSYLAWY QQKPGQPPKLLIYH <u>A</u> SYLTSGVPSRFSRSGTEF TLTISDLECDAAATYYCQSAYYSSSADNTFGGGT EYVVK	230
rab600_24_62	ALVMTQTPASVSAAVGGTVTINCQASEDIDSYLA WYQQKPGQPPKLLIY <u>Y</u> ASYLTSGVPSRFKGS TEYTLTISGVQCDDAAATYYCQSAFYNNNTETA FGGGTEVVVK	231
rab600_24_97	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASEDIENYL <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIYDASDLTSGVPSRFKGS GTQFTLTISDLECAATAFYCQSVYYTSSDNYNN <u>A</u> FGGGTEVVVK	232
rab600_24_124	IKMTQTPASVSAAVGGTVTINCRASEDIESYLAW YQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRVKGS EFTLTISGVRCDAAATYYCQHGFYTSRSDSVFGG GTEVVVK	233
rab600_25_10	DVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSISSYLS WYQQKPGQPPKLLIY <u>R</u> ASTLESGVPSRFKGS TEFTLTISDLECAATAFYCQCGYYGGSYIGAFG GGTEVVVK	234
rab600_25_20	DVVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQSIGGVLS WYQQKPGQPPKLLIY <u>R</u> ASTLESGVPSRFKGS ESGT	235

	EFTLTISDLECADAATYYC <u>QC</u> NYYGGSYIGAFGG GTEVVVK	
rab600_25_31	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQSVSNNNYLS</u> WYQQKPGQPPKLLIYA <u>ASYLASGVPPRFSGSGSG</u> TQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>CLGDYDNDIDHA</u> FGG GTEVVVK	236
rab600_25_103	DVVMTQTPASVEAAVGGTVTINC <u>QASQ</u> SISNLLA WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASTLES</u> GVPSRFBKSGSG TEFTLTISDLECADAATYYC <u>QCSYYGGSYIGAFGG</u> GTEVVVK	237
rab600_23_7H2.5	LDIKVTQTPAVSAAVGGTVSINC <u>QASEDIKNYLA</u> WYQQKPGQRPKLLIY <u>DASKLAS</u> GVPSRFBKSGSG TEYTLTISDLECDDAATYYC <u>QHGYTSGXDNTFG</u> GGTEVVVK	238
rab600_23_8G10.7	IEMTQTPFSVSAAVGGTVTINC <u>QASENIYSSLAWY</u> QQKPGQPPKLLIYA <u>AASDLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEY TLTISGVQCADAATYYC <u>QSAYSSGSDDNGF</u> GGGT EVLVK	239
rab600_23_8G11.5	ADIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC <u>QASQSIY</u> TALA WYQQKSGQPPKLLIYA <u>AAS</u> TLASGVPSRFBKSGSG TQFTLTISDLECADAATYYC <u>QNYYYGDNTYNNTF</u> GGGTEVVVK	240
rab600_23_9B11.2	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIK <u>QASQ</u> TISNLL <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIS <u>RASILAS</u> GVPSRFBKSGESG TXFTLTITDLECADAATYYC <u>QSNYYSSSSSYGN</u> TF GGGTEVVVK	241
rab600_23_11D7.1	QVLTQTPSSVSEPVGTVTINC <u>QASENIYSGLAWY</u> QQKPGQPPKLLIV <u>SAFTLAS</u> GVPSRFBKSGTGTEF TLTISGVQCDDAATYYC <u>QTYYYGSVTYFNA</u> FGG GTEVVVK	242
rab600_23_11G12.1	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIK <u>QASQ</u> SISSTYL <u>S</u> WYQQKPGQRPKLLIY <u>QASTLAS</u> GVPSRFBKSGS GTEFTLTISDLECADAATYYC <u>QGGYFSDNGCYNA</u> FGGGTEVVVK	243

rab600_23_28B7.3	AVLTQTPSSVSAAVGGTVTLNC <u>QSSQSIDANNDL</u> <u>A</u> WYQQKPGQPPRLLIY <u>LASKLAS</u> GVPSRFSGSGS GTQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>LGGYDDDADNTF</u> GGGTEVVVK	244
rab600_23_37D1.4	ADIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC <u>QASQSIYTALA</u> WYQQKSGQPPKLLIY <u>AAS</u> TLASGVPSRFBKSGSGS TQFTLTISDLECAATAATYYCQNYYYGDNTYNNTF GGGTEVVVK	245
rab600_23_37H4.1	AVLTQTPSSVSAAVGGTVTLNC <u>QSSQSIDANNDL</u> <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>LA</u> STRASGVPSRFBKSGSGS GTQFTLTISGVQCYDAATYYC <u>LGGYDDDADNTF</u> GGGTEVVVK	246
rab600_23_55F6.6	ADIVMTQTPASVSVPVGGTVTIKC <u>QASQSIYNYLS</u> WYQQKPGQPPKRLIYYASTLASGVPSRFSGSGSG TEFTLTISDLECAATAATYYCQNSGVNGNRYGNA FGGGTEVVVK	247
rab600_23_4	ADIVMTQTASPVSAAVGGTVTIKC <u>QATESISSWL</u> <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>GASTLE</u> SGVPSRFSGSGS GTEFTLTISGVQCDDAATYYCQQGYIYTNDNTF GGGTEVVVK	248
rab600_23_6	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASQTISNELS</u> WYQQKSGQPPKLLIY <u>RA</u> STLASGVPSRFSGSGSGT EFTLTISGVECDAAATYYCQQGYTTNNVDNLFGG GTEVVVK	249
rab600_23_8	ADIVMTQTPSSVSAAVGGTVTIRC <u>QASESIGNALA</u> WYQLKPGQRPKLLIYYTSTLASGVPSRFBKSGSGS TEFTLTISDLECDAAATYYCQSYDSVSSYGVGFG GGTEVVVK	250
rab600_23_21	IEMTQTPFSVSAAVGGTVTINC <u>QASENIYRSLAWY</u> QQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFBKSGSGTEY TLTISGVQCADAATYYCQSAYTSSNTDNAFGGGT EVLVK	251
rab600_23_24	ADIVMTQTPSSVSAAVGGTVTIYC <u>QASQSIPSLLA</u> WYQQKSGQPPKLLIY <u>AP</u> STLASGVPSRFBKASGSG	252

	TQFTLTISDLECADAAATYYC <u>QSYYYGDNTYNNIF</u> GGGTEVVVK	
rab600_23_33	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQDVKNNDL</u> <u>AWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGGGS</u> GTQFSLTISGVQCDDAAATYYC <u>CLGGYDDDADNAF</u> GGGTEVVVK	253
rab600_23_45	ALVMTQTPASVEAVVGGTVTINC <u>QASQISISNLLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>ASTLASGVPSRFGSGSG</u> TEYTLTIAGVQCADAAAYYC <u>QGYYSSTDMLA</u> FGGGTEVVVK	254
rab600_23_50	IDMTQTPSSVSAGVGDVTINC <u>QASENIYSFLAWY</u> QQKPGHSPKLLIY <u>FASKLASGVSSRFGSGSGTQF</u> TLTISDVQCDDAAATYYC <u>QQTYSYSDADNTF</u> GGGT EVLVK	255
rab600_23_52	QVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC <u>QSSQSVYRNNDL</u> <u>AWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGS</u> GTQFTLTISDVQCDDAAATYYC <u>CLGSYDCSSGDCFT</u> FGGGTEVVVK	256
rab600_23_57	DVVMTQTPSSVSEPVGGTVTIK <u>QASEEISSNLAW</u> YQQKPGQPPKLLMY <u>AASNLASGVSSRLKGSRS</u> GT DYTLTISGVQCDDAAATYFC <u>QCTYIGSGYVVA</u> FGG GTEVVVK	257
rab600_23_62	QVLTQTPSSVSEPVGGTVTINC <u>QASENIYNALAW</u> YQQKPGQPPKLLIY <u>RASSLASGVPSRFSGSGSGTE</u> FTLTISAVQCDDAAATYYC <u>QTCYYDSATYFNT</u> FGG GTEVVVK	258
rab600_23_70	QVLTQTASPVSAAVGGTVTINC <u>QASQSVYNKNYL</u> <u>AWFQQKPGQPPKRLIYQASKLASGVSSRFGSGS</u> GTQFTLTISDVQCDDAAATYYC <u>CLGTACSSADCNV</u> FGGGTEVVVK	259
rab600_23_71	IKMTQTLASVSAAVGGTGSISC <u>QASEDIGNYVAW</u> YQQKPGQPPKFLIYDT <u>SHLASGVPSRFGSRSGKE</u> FTLTISGVQCDDAAATYYC <u>QHGYTSDTDNT</u> FGGG TEVVVK	260

rab600_23_75	QVLTQTPSSVSEPVGGTVTINC <u>QASENIYNSLAWY</u> QQKPGQPPKLLIY <u>QASSLASGVPSRFSGSGSGTEF</u> TLTISGVQCDDAATYYC <u>QSYYYSSVTYFNTFGGG</u> TEVVVK	261
rab600_23_79	AVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC <u>QSSQSVNNNDLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>QASTLASGVDPDRFSGSGSG</u> TQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>CLGGYDDDADNAFG</u> GGTEVVVK	262
rab600_23_80	DVVMTQTPASVSAAVGGTVTINC <u>QASESIYSNLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASTLASGVPSRFBKSGSG</u> TEYTLTISDLECAATAATYYC <u>QGYLYSSSVSYGNT</u> FGGGTEVVVK	263
rab600_23_81	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASESIANELS</u> WYQRKSGQPPKLLIY <u>RASTLASGVPSRFBKSGSG</u> TQFTLTISGVECDATAATYYC <u>QQGYTTINIDNLF</u> GG GTEVVVK	264
rab600_23_82	ANIKMTRTPFSVSAAVGGTVTINC <u>QASESVYSNL</u> <u>AWF</u> QQKPGQPPKLLIY <u>AASNPA</u> SGVPSRFSGSGS GTEYTLTISGVQCDDAATYYC <u>QSAYYSGSGDVA</u> F GGGTEVVVK	265
rab600_23_85	ADIVLTQTPASVGAAVGGTVTIKC <u>QASQTISTYLA</u> WYQQKPGRPPKLLIY <u>KASTLASGVSSRFBKSGSG</u> TEFTLTISDLECAATAATYYC <u>QSYWGTSDIYA</u> FG GGTEVVVK	266
rab600_23_90	IEMTQTPFSVSAAVGGTVTINC <u>QASENIYSSLAWY</u> QQKPGQPPKLLIY <u>AASDLASGVPSRFBKSGSGTEY</u> TLTISGVQCADVATYYC <u>QHAYYSGIVDNGF</u> GGGT EVVVK	267
rab600_23_102	ALVMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASQSITNYLA</u> WYRQKPGQPPKLLIY <u>GASKLASGVPSRFSGSGSG</u> TEYTLTISGVQCDDAATYYC <u>QQGYTSSNVDN</u> PFG GGTEVVVK	268
rab600_23_105	ALVMTQTPSSVSAAVGGTVTINC <u>QASQNIYSNLA</u> WYQQKPGQRPKLLIY <u>YTSNLASGVSSRFBKSGSG</u>	269

	TEYTLTISDLECDAAATYYC <u>QSA</u> YYSSSADNAFG GGTEVVVK	
rab600_23_106	ADIVMTRTPVSVEAAVGGTVTIK <u>CQASE</u> SIDSNLA WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASTLAS</u> GVPSRFGSGSG TEFTLTISDLECADAAATYYC <u>QSNYYTTSTSYGNPF</u> GGGTEVVVK	270
rab600_23_107	AYDMTQTPATVEVAVGGTVTINC <u>QASQ</u> SISNLLA WYQQKPGQRPKLLIY <u>DTSDLAS</u> GVPSRFGSGSGSG TEYTLTITGVECADAATYYC <u>QQGYSSSNIDNVFG</u> GGTEVVVK	271
rab600_23_108	ADIVMTQTPFSVSAAVGGTVTINC <u>QASE</u> SIYSNLA WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASTLAS</u> GVPSRFGSGSGSG TEYTLTISDLECADATTYYC <u>QGY</u> YYSSSSSYGNTF GGGTEVVVK	272
rab600_23_110	QVLTQTPSPVSVAVGGTVTINC <u>QATQ</u> SVYDNNAL <u>SWY</u> QQKPGQPPKLLIY <u>AAS</u> TLASGVPSQFKGSGS GTQFTLTISDVQCDDAATYHCLGSYSGGIRAFGG GTEVVVK	273
rab600_23_114	QVLTQTPSSVSEPVGATVTINCH <u>ASE</u> NIYASLAWY QQKPGQPPKLLIY <u>SAFTLAS</u> GVPSRFGSGSGSGTEF TLTISGVQCDDAATYYC <u>QSY</u> YYSSVTYFNVFGGG TEVVVK	274
rab600_23_119	AFEMTQTPSSVEAAVGGTVTIK <u>CQASQ</u> SIYNALA WYQQKPGQPPKLLIY <u>FAATLTSG</u> VPSRFGSGSGSG TEYTLTISDLECADAGTYYY <u>QSY</u> YDGVPGFWPFG GGTEVVVK	275
rab600_23_123	IVMTQTPSSKSPVGDVTINC <u>QASE</u> SVYGNNWL <u>A</u> WYQQKAGQPPKLLIY <u>QASTLAS</u> GVPSRFGSGSGS GTQFTLTISDVVCDDAATYYCTGWKDEIDGIGFG GGTEVVVK	276
rab600_23_127	DVVMTQTPASVSGPVGGTVTIK <u>CQASQ</u> NIDSDLA WYQQKPGQRPKLLIY <u>DASKLAS</u> GVPSRFGSGSGYG TEFTLTISGVQCEDAATYYC <u>QY</u> TTYINTYGGAFG GGTEVVVK	277

rab600_23_129	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTINC <u>QASQSSSNLL</u> <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASTLAS</u> GVPSRFGKSGS GIEFTLTISDLECADAATYYC <u>QTNYYRSSSSTYEG</u> <u>A</u> FGGGTEVVVK	278
rab600_23_130	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASQSISNLLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASDLAS</u> GVPSRFGKSGSG TEFTLTISGVQCADAATYYC <u>QQGYSYSNVDNAFG</u> GGTEVVVK	279
rab600_23_132	AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKC <u>QASQSISNALAW</u> YQQKPGQPPKLLIY <u>SASTLAS</u> GVPSRFGKSGSGTE YTLTISDLECADAASYC <u>QGYDYGSSIGFWPFGG</u> GTEVVVK	280
rab600_23_133	AVLTQTPSPVSEPVGGTVTINC <u>QSSQSIYSNNYLS</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>KASTLAS</u> GVPSRFGKSGSG TQFTLTISDVQCDDAATYYC <u>AGDYDITTDIVFGG</u> GTEVVVK	281
rab600_23_135	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKC <u>QASEDIESYL</u> <u>A</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>GASTLES</u> GVPSRFGKSGS GTQFTLTISDLECADAATYFC <u>QSYYYTDSNDYGA</u> <u>NNV</u> FGGGTEVVVK	282
rab600_23_140	DVVMTQTPASVSEPVGGTITINC <u>QASEDIESYLA</u> WYQQKPGQRPKLLIY <u>GASNLAS</u> GVSSRFGKSGSGT QFTLTISDLECADAATYYC <u>QCTYYATIYANVVFG</u> GGTEVVVK	283
rab600_23_141	QGPTQTPSSVSAVGGTVTINC <u>QTSESVNSNNILS</u> WYQQKPGQPPKLLVYDT <u>STLAS</u> GVPSRFGKSGSG TQFTLTISDVQCDDAATYYC <u>QGSYASSGWYVAF</u> GGGTEVVVK	284
rab600_23_148	QGPTQTPSSVSAVGGTVTINC <u>QTSESFGGGNILS</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>DSSTLTSG</u> VPSRFRGSGSGT QFTLTISGVQCDDAATYYC <u>QGSDHSGAWYAFGG</u> GTEVVVK	285
rab600_23_152	AVLTQTPSPVSVVVGTVTIKC <u>QSSQTIYSNYLSW</u> YQQRPGQPPKLLIW <u>SASSLAS</u> GVPPDRFSGSGSGTQ	286

	FTLTISGVQCDDAATYYCLGGYDDDDADPNAFGG GTEVVVK	
rab600_23_153	AQVVMQTTPAVSAAVGGTVTIKCQASQNIYSNL <u>AWYQQKPGQPPKLLIYGTSTLASGVPSRFSGSGS</u> GTDFTLTISGVQCEDAATYYCQGYYYSSRSADTA FGGGTEVVVK	287
rab600_23_158	IVMTQTPSSKSVPVGDTVINCQASESVYGNNWL <u>AWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGS</u> GTQFTLTISDVVCDDAATYYCTGFKDEIAGTAFG GGTEVVVK	288
rab600_23_163	ANIVLTQTASPVSGAVGGTVTIKCQASQNIYSNLA WYQQKPGQPPNLLIYYTSTLASGVPSRFBKSGSG AEYTLTISGVQCDDAATYYCQSAYYSGSGNCAFG GGTEVVVK	289
rab600_23_165	QVLTQTPSSTSEPVGGTVTINCQASQSISSYLSWY QQKPGQPPKLLIYSASTLASWVPKRFSGSRSGTQF TLTISGVQCDDAATYYCLGAYGYTSDDAFAFGG GTEVVVK	290
rab600_23_167	IVMTQTPSSKSVPVGDTVINCQASESVYGNNWL <u>AWYQQKTGQPPKLLIYQASTLASGVPSRFBKSGS</u> GTQFTLTISDVVCDDAATYYCTGWKDEIDGIAFG GGTEVVVK	291
rab600_23_177	ALVMTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASQSVYDSNY <u>LAWFQQKPGQPPKLLIWYVSTLASGVDPDRFSGSG</u> SGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGLYGDDSFDTWA FGGGTEVVVK	292
rab600_23_182	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASESIYNFLA WYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGVPSRFBKSGSG TEYTLTISDLECAATAATYYCQQGYDYSDVDNAF GGGTEVVVK	293
rab600_25_9	ALVMTQTPASVEADVGGTVTINCQASESISNLLA WYQQKPGQRPKLLIYRASILTSGVSSRFBKSGSGT EYTLTINGVQCADAATYYCQHGYTGTVNQNVFG GGTEVVVK	294

rab600_25_14	QVLTQTSPSSTA AVGGTVTINC <u>QSSQSVYKSDWL</u> <u>GWYQQKPGQPPKLLIYKASTLAS</u> GVPSRFGSGS GTQFTLTISDLECDAAATYYC <u>QGGYSPASYPFGG</u> GTEVVVK	295
rab600_25_26	AYDMTQTPASVEVPVGGTVTIKC <u>QASQSISIYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIRD <u>ASDLAS</u> GVPSRFTGSGSG AQFTLTISGVECADAATYYC <u>QQGLNSIGF</u> GGGTE VVVK	296
rab600_25_37	AGDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASQSINIYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIYD <u>ASKLAS</u> GVPSRFSGSGSG TEFTLTISDLECADAAATYYC <u>QQGINNIGF</u> GGGTEV VVK	297
rab600_25_38	QVLTQTASPVSA AVGGTVSISC <u>QSSENVYKNNYL</u> <u>AWFQHKPGQPPKRLIDSASTLES</u> GVPSRFSGSGSG TQFTLTISGVQCDDAAATYYC <u>VALYSGNIYIVGGG</u> TEVVVK	298
rab600_25_42	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASESIFSYLA</u> WYQQKPGQRPKLLIYYASTLASGVPSRFGSGSG TQFTLTISGVECADAATYYC <u>QQGYDFS</u> AVDNVFG GGTEVVVK	299
rab600_25_43	AVLTQTSPSPVSA AVGGTVTISC <u>QSSQSVSNNNYLS</u> WYQQKPGQPPKLLIYAASYLETGVP SRFSGSGSG TQFTLTISGVQCDDAAATYYC <u>LGDYDNDVDHAFG</u> GGTEVVVK	300
rab600_25_46	QVLTQTASPVSA AVGSTVTINC <u>QASRSVYNNNYL</u> <u>SWFQQKSGQPPKLLIYSASTLP</u> SGVSSRFGSGSG TQFTLTISDVQCDDAAATYYC <u>LGNYDCGSADCYAF</u> GGGTEVVVK	301
rab600_25_48	AYDMTQTPASVEAVVGGTVTINC <u>QASQSIISNLLA</u> WYQQKPGQRPKLLIYYASTLASGVSSRFGSGSG TEFTLTISDVECADAATYYC <u>QQGYSSGNLDNGFG</u> GGTEVVVK	302
rab600_25_51	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC <u>QASQSIYSYLA</u> WYQQKPGQPPKQLIYYTSTLASGVPSRFSGSGSG	303

	TEFTLTISGVECADAATYYC <u>QQGYSKTDLDNA</u> FG GGTEVVVK	
rab600_25_54	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQSVSNDNYLS</u> WYQQRPEQPPKLLIYA <u>AASYLASGVPSRFS</u> SGSGSGT QFTLTISGVQCDDAATYYC <u>CLGDYDNDVDHA</u> FGG GTEVVVK	304
rab600_25_63	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQSVSNNNYLS</u> WYQQKPGQPPKLLIYA <u>AASYLASGVPSRFS</u> SGSGSG TQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>CLGDYDNDVDHA</u> FG GGTEVVVK	305
rab600_25_70	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQSVDSNNDL</u> <u>A</u> WYQRKPGQPPKLLIY <u>QASKLASGVPSRFS</u> SGSGS GTQFTLTISGVQCDDAATYYC <u>CLGGYDDDADNA</u> F GGGTEVVVK	306
rab600_25_71	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIK <u>CQASQSISSYLN</u> WYQQKPGQPPKLLIYS <u>SASTLASGVPSR</u> FKGSGSG TQFTLTISGVECADAATYYC <u>QQGYSDSNIDNV</u> FG GGTEVVVK	307
rab600_25_75	QVLTQTASPVSAAVGNTVTINC <u>QASQSVYNNNYL</u> <u>S</u> WFQQKPGQPPKLLIYS <u>SASTLP</u> SGVSSRFGSGSG TQFTLTIRDVQCDDAATYYC <u>CLGNYDCGSADCYA</u> FGGGTEVVVK	308
rab600_25_82	ALVMTQTPASVEAAVGGTVTINC <u>QASQSI</u> SNLLA WYQQKPGQRPKLLIY <u>RASTLASGVPSR</u> FKGSGAG TEYTLTISGVQCDDAATYHC <u>QHGYTG</u> SNVHNVF GGGTEVVVK	309
rab600_25_84	AVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC <u>QSSQSVSNNNYLS</u> WYQQKPGQPPKLLIYA <u>AASYLASGVPSRFS</u> SGSGSG TQFTLIISGVQCDDAATYYC <u>CLGDYDNDVDHA</u> FGG GTEVVVK	310
rab600_25_92	ADIVMTQTPASVEAAVGGTVTIK <u>CQASESID</u> SGLA WYQQKPGQRPKLLIY <u>DSSTLASGVPSR</u> FKGSGSG TDFTLTISDLECADAATYYC <u>QSNYDTGSSVYD</u> WG <u>S</u> FGGGTEVVVK	311

rab600_25_93	LVMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQASQSLYNKDAC SWYQQKPGQPPKLLIYYAFTLASGVPSRFGSGS GTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGDFISSSDNGFG GGTEVVVK	312
rab600_25_97	QVLTQTASSVSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNWL AWYQQKPGQRPKLLIYDASKLASGVPSRFGSGS GTRFTLTISDVQCDDAATYYCLGGYPGGSDVHAF GGGTEVVVK	313
rab600_25_100	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIVTYLA WYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFGSGSG TQFTLTISGVECADAATYYCQQGINNIAFGGGTEV VVK	314
rab600_25_108	AIKMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASENINSWLA WYQQKPGQPPKLLIYEASKLASGVPSRFGSGSG TQFTLTISDLECADAATYYCQQGYIYIDVGNIFGG GTEVVVK	315
rab600_25_110	AIKMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASESISSWLSW YQQKPGQRPKLLIYEASKLASGVPSRFGSGSGT QFTLTISDLECADAATYYCQQGYIYIDVGNTFGG GTEVVVK	316
rab600_25_111	AALTQTPSPVSAAVGGTVTIKCQSSQSVDNNNEL SWYQQKPGRPPMLLIYAASNLASGVPSRFSGSGS GTQFSLTISGVQCDDAATYYCLGGYDDDAENAF GGGTEVVVK	317
rab600_25_114	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASESIGNNLA WYQQKPGQPPKLLIYGTSTLASGVPSRFGSRSG TEFTLTISDLECADAATYYCQCTYYGSSYVESSFG GGTEVVVK	318

Таким образом, в определенных вариантах реализации антители или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 и содержит VH и соответствующую область VL, выбранную из **таблицы Н2**. В конкретных вариантах реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133 и 135. В некоторых вариантах реализации область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID

NO:104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 134 и 136. В конкретных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

область VH, представленную в SEQ ID NO:103, и область VL, представленную в SEQ ID NO:104;

область VH, представленную в SEQ ID NO:105, и область VL, представленную в SEQ ID NO:106;

область VH, представленную в SEQ ID NO:107, и область VL, представленную в SEQ ID NO:108;

область VH, представленную в SEQ ID NO:109, и область VL, представленную в SEQ ID NO:110;

область VH, представленную в SEQ ID NO:111, и область VL, представленную в SEQ ID NO:112;

область VH, представленную в SEQ ID NO:113, и область VL, представленную в SEQ ID NO:114;

область VH, представленную в SEQ ID NO:115, и область VL, представленную в SEQ ID NO:116;

область VH, представленную в SEQ ID NO:117, и область VL, представленную в SEQ ID NO:118;

область VH, представленную в SEQ ID NO:119, и область VL, представленную в SEQ ID NO:120;

область VH, представленную в SEQ ID NO:121, и область VL, представленную в SEQ ID NO:122;

область VH, представленную в SEQ ID NO:123, и область VL, представленную в SEQ ID NO:124;

область VH, представленную в SEQ ID NO:125, и область VL, представленную в SEQ ID NO:126;

область VH, представленную в SEQ ID NO:127, и область VL, представленную в SEQ ID NO:128;

область VH, представленную в SEQ ID NO:129, и область VL, представленную в SEQ ID NO:130;

область VH, представленную в SEQ ID NO:131, и область VL, представленную в SEQ ID NO:132;

область VH, представленную в SEQ ID NO:133, и область VL, представленную в SEQ ID NO:134; или

область VH, представленную в SEQ ID NO:135, и область VL, представленную в SEQ ID NO:136.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2) и содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и

VHCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R1**; и соответствующую (по названию клона) переменную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R2**. В некоторых вариантах реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из **таблицы R1**, и область VL содержит соответствующую (по названию клона) аминокислотную последовательность, выбранную из **таблицы R2**.

В некоторых вариантах реализации, как было отмечено выше, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), например, растворимый или экспрессируемый в клетках TNFR2. В конкретных вариантах реализации TNFR2 представляет собой TNFR2 человека или его пептидный эпитоп. Примеры пептидных эпитопов TNFR2 человека приведены в **таблице T1** ниже.

Таблица T1. Примеры пептидных эпитопов TNFR2		
Домен и остатки	Последовательность	SEQ ID NO:
PLAD или CRD1 а.к. 17-54 зрелого TNFR2	TCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTS DTVCD	319
PLAD или CRD1 а.к. 18-58 зрелого TNFR2	CRL <u>RE</u> YYDQ <u>T</u> AQMCC <u>S</u> KCSPGQHAKVFCTKTSD <u>T</u> VCDS <u>C</u> ED	327
Эпитоп а.к. 21-23 зрелого TNFR2	REY	Н/Д
Эпитоп а.к. 27-34 зрелого TNFR2	TAQMCCSK	328
Эпитоп а.к. 51-55 зрелого TNFR2	TVCD	329
CRD2 а.к. 58-93 зрелого TNFR2	DSTYTQLWNWVPECLSCGSRCS SDQVETQACTRE QN	320
CRD3 а.к. 106-133 зрелого TNFR2	LSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTE	321

CRD3 а.к. 114-133 зрелого TNFR2	LCAPLRKCRPGFGVARPGTE	322
CRD4 а.к. 146-174 зрелого TNFR2	TFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNAS	323

В определенных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TNFR2 человека, например, по меньшей мере один пептидный эпитоп TNFR2 человека, выбранный из **таблицы Т1**, например, по меньшей мере один, два, три, четыре или пять пептидных эпитопов, выбранных из **таблицы Т1**. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TNFR2 человека по пептидному эпитопу, который содержит, состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из R21, Y23, T27, S33, K34, T51 и S55, как определено для последовательности зрелого TNFR2 человека (остатки 23-461 FL TNFR2 человека). В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TNFR2 человека по пептидному эпитопу, который содержит, состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из REY, TAQMCCSK (SEQ ID NO:328) и TVCDS (SEQ ID NO:329). В конкретных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 человека при K_D примерно 2 нМ или менее или при K_D примерно 0,7 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2 яванского макака, например, он перекрестно связывает TNFR2 человека и TNFR2 яванского макака.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист TNFR2. Например, в некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или иным образом снижает связывание ФНО- α с TNFR2. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или иным образом снижает мультимеризацию или тримеризацию TNFR2. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует или иным образом снижает опосредованную TNFR2 активацию Т-регуляторных клеток (Treg), например, системно или в микроокружении опухоли. В конкретных вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает TNFR2, представляет собой антагонист TNFR2 и по существу не связывает рецептор 1 фактора некроза опухоли (TNFR1), например, TNFR1 человека. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по существу не связывает медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD40, рецептор смерти 6 (DR6) и/или остеопротегерин (OPG).

В некоторых вариантах реализации, например, *in vitro* или *in vivo*, антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает уничтожение/истощение опухолевых

клеток (например, экспрессирующих TNFR2 опухолевых клеток), T_{reg} и/или миелоидных супрессорных клеток (МСК) посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), например, примерно или по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000% или более относительно контроля или препарата сравнения. В некоторых вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент усиливает уничтожение/истощение опухолевых клеток (например, экспрессирующих TNFR2 опухолевых клеток), T_{reg} и/или МСК посредством опосредованного макрофагами антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), например, примерно или по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000% или более относительно контроля или препарата сравнения. В некоторых вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент снижает подавление иммунной системы, опосредованное МСК, например, примерно или по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000% или более относительно контроля или препарата сравнения. В некоторых вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент превращает МСК и/или макрофаги M2 в провоспалительные макрофаги M1 и/или превращает T_{reg} в эффекторные Т-клетки, например, усиливая указанную конверсию примерно или по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000% или более относительно контроля или препарата сравнения. В некоторых вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент превращает «холодные» опухоли в «горячие» опухоли. «Холодная» опухоль представляет собой опухоль, которая не была распознана иммунной системой или не спровоцировала сильный ответ иммунной системы. Например, в микроокружении холодной опухоли, как правило, присутствует низкий или незначительный уровень CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток; вместо этого, в нем часто имеется относительно высокий уровень миелоидных супрессорных клеток и/или Treg, которые секретируют иммуносупрессорные цитокины, препятствующие перемещению CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток в микроокружение опухоли. В противоположность этому, «горячая» опухоль представляет собой опухоль с высоким уровнем CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, что приводит к воспалению микроокружения опухоли. В конкретных вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет комбинацию любых одной или более из приведенных выше характеристик.

Исключительно для иллюстрации, связывающие взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и полипептидом TNFR2 могут быть обнаружены и количественно определены разнообразными стандартными способами, включая исследования на системах Biacore (например, с соответствующими мечеными растворимыми реагентами, связанными с сенсорным чипом), FACS-анализы с использованием клеток, на поверхности которых экспрессируется полипептид TNFR2 (как нативный, так и рекомбинантный), иммуноанализы, исследования флуоресцентного

окрашивания, исследования ELISA и микрокалориметрические подходы, такие как ИТС (изотермическая титрационная калориметрия).

Как хорошо известно в данной области техники, антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфически связывать мишень, такую как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., через по меньшей мере один сайт распознавания эпитопа, расположенный в варибельной области молекулы иммуноглобулина. В настоящем документе термин включает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), синтетические варианты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, содержащие область антитела с антигенсвязывающим фрагментом с требуемой специфичностью, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт или фрагмент (сайт распознавания эпитопа) с требуемой специфичностью. «Диатела», мультивалентные или полиспецифические антитела, созданные путем слияния генов (WO94/13804; P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993) также являются конкретной формой антитела, рассматриваемой в настоящем документе. Мини-антитела, содержащие scFv, присоединенную к домену CH3, также включены в настоящий документ (S. Hu et al., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996). См., например, Ward, E. S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989); Bird et al., Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); PCT/US92/09965; WO94/13804; P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993; Y. Reiter et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996; S. Hu et al., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» в настоящем документе относится к фрагменту полипептида, который содержит по меньшей мере один CDR тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина, который связывает антиген, представляющий интерес, в частности, TNFR2. В этом отношении антигенсвязывающий фрагмент антител, описанных в настоящем документе, может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR последовательностей VH и VL, представленных в настоящем документе, составляющих антитела, связывающие TNFR2.

Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, способной связываться с селективным связывающим агентом, таким как антитело, и, кроме того, допускающей применение у животного для выработки антител, способных связывать эпитоп указанного антигена. Антиген может содержать один или более эпитопов.

Термин «эпитоп» включает любую детерминанту, предпочтительно полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается с антителом. В определенных вариантах реализации эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорил или сульфонил, и могут в определенных вариантах

реализации иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда. В определенных вариантах реализации утверждается, что антитело специфически связывает антиген, если оно предпочтительно распознает антигенную мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Утверждается, что антитело специфически связывает антиген, если равновесная константа диссоциации составляет $\leq 10^{-7}$ или 10^{-8} М. В некоторых вариантах реализации равновесная константа диссоциации может составлять $\leq 10^{-9}$ М или $\leq 10^{-10}$ М.

В определенных вариантах реализации антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, такие как описано в настоящем документе, включают набор CDR тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, расположенных между набором каркасной области (FR) тяжелой цепи и легкой цепи, которые являются основанием для CDR и определяют пространственное расположение CDR друг относительно друга. В настоящем документе термин «набор CDR» относится к трем гипервариабельным участкам в V-области тяжелой или легкой цепи. Начиная от N-конца тяжелой или легкой цепи, указанные участки обозначают «CDR1», «CDR2» и «CDR3», соответственно. Антигенсвязывающий сайт, таким образом, включает шесть CDR, содержащих набор CDR каждой из V-областей тяжелой и легкой цепей. Полипептид, содержащий один CDR, (например, CDR1, CDR2 или CDR3) называют в настоящем документе «единицей молекулярного распознавания». Кристаллографический анализ ряда комплексов антиген-антитело продемонстрировал, что аминокислотные остатки CDR формируют обширную область контакта со связанным антигеном, причем наиболее сильный контакт антигена происходит с CDR3 тяжелой цепи. Таким образом, единицы молекулярного распознавания ответственны, главным образом, за специфичность антигенсвязывающего сайта.

В настоящем документе термин «набор FR» относится к четырем фланкирующим аминокислотным последовательностям, которые обрамляют CDR из набора CDR V-областей тяжелой или легкой цепи. Некоторые остатки FR могут контактировать со связанным антигеном; тем не менее FR отвечают, главным образом за укладку V-области в антигенсвязывающем сайте, в частности, остатки FR, расположенные непосредственно рядом с CDR. Внутри FR определенные аминокислотные остатки и определенные структурные отличительные признаки являются крайне высококонсервативными. В связи с этим все последовательности V-области содержат внутреннюю дисульфидную петлю примерно из 90 аминокислотных остатков. При укладке V-областей в сайт связывания, CDR отображаются в виде выступающих петлевых мотивов, которые образуют антигенсвязывающую поверхность. Общеизвестно, что существуют консервативные структурные области FR, которые влияют на форму укладки петель CDR в определенные «канонические» структуры независимо от точной аминокислотной последовательности CDR. Кроме того, известно, что определенные остатки FR участвуют в нековалентных междоменных контактах, которые стабилизируют взаимодействие тяжелой и легкой цепей антитела.

Структуры и расположение вариабельных доменов иммуноглобулина могут быть

определены согласно Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4e издание. US Department of Health and Human Services. 1987, и в обновленных версиях, доступных в настоящее время в сети Интернет (immuno.bme.nwu.edu).

«Моноклональное антитело» относится к популяции гомогенных антител, причем моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и не встречающихся в природе), которые участвуют в селективном связывании эпитопа. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и нацелены на один эпитоп. Термин «моноклональное антитело» включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (сайт распознавания эпитопов) с требуемой специфичностью, способный связывать эпитоп. Предполагается, что данный термин не ограничен источником антитела или способом его получения (например, с использованием гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные в настоящем документе в определении «антитела».

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F(ab)) содержат ковалентный гетеродимер, который включает интактный антигенсвязывающий сайт. Фермент пепсин может расщеплять молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')₂, который содержит оба антигенсвязывающих сайта. Фрагмент Fv для применения согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения может быть получен путем предпочтительного протеолитического расщепления IgM и в редких случаях молекулы иммуноглобулина IgG или IgA. Фрагменты Fv, тем не менее, чаще получают рекомбинантными способами, известными в данной области техники. Фрагмент Fv включает нековалентный гетеродимер V_H::V_L, включающий антигенсвязывающий сайт, который сохраняет большую часть способности молекулы нативного антитела, касающуюся распознавания и связывания антигена. Inbar *et al.* (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659-2662; Hochman *et al.* (1976) *Biochem* 15:2706-2710; и Ehrlich *et al.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096.

В определенных вариантах реализации рассматривают одноцепочечные антитела Fv или scFv. Например, тела Каппа (Ill *et al.*, *Prot. Eng.* 10: 949-57 (1997); мини-антитела (Martin *et al.*, *EMBO J* 13: 5305-9 (1994); диатела (Holliger *et al.*, *PNAS* 90: 6444-8 (1993); или янусины (Traunecker *et al.*, *EMBO J* 10: 3655-59 (1991) и Traunecker *et al.*, *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 51-52 (1992) могут быть получены стандартными способами молекулярной биологии согласно общим идеям настоящей заявки, касающимся выбора антител, имеющих желаемую специфичность. В некоторых вариантах реализации могут быть получены биспецифические или химерные антитела, которые включают лиганды согласно

настоящему изобретению. Например, химерное антитело может содержать CDR и каркасные области от разных антител, при этом могут быть получены биспецифические антитела, которые специфически связывают TNFR2 через один связывающий домен и вторую молекулу через второй связывающий домен. Указанные антитела могут быть получены рекомбинантными способами молекулярной биологии или могут быть физически конъюгированы друг с другом.

Одноцепочечный полипептид Fv (scFv) представляет собой ковалентно связанный гетеродимер $V_H::V_L$, который экспрессируется из слитого гена, включающего гены, кодирующие V_H и V_L , связанные линкером, кодирующим пептиды Huston *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883. Был описан ряд способов для распознавания химических структур, позволяющих превращать естественно агрегированные, но химически разделенные легкие и тяжелые полипептидные цепи из V-области антитела в молекулу scFv, которая может укладываться в трехмерную структуру, по существу схожую со структурой антигенсвязывающего сайта. См., например, патенты США №5091513 и 5132405, авторы Хастон (Huston *et al.*); и патент США №4946778, авторы Ладнер (Ladner *et al.*).

Определенные варианты реализации включают «про-антитела», или антитела, в которых сайт(-ы) связывания замаскирован(-ы) или по иным причинам остается(-ются) инертным(-и) до активации посредством протеолитического расщепления в целевой или пораженной заболеванием ткани. Некоторые из указанных и схожих вариантов реализации содержат один или более маскирующих фрагментов, которые стерически затрудняют антигенсвязывающий(-е) сайт(-ы) антитела, и которые гибридизированы с антителом посредством одного или более протеолитически расщепляемых линкеров (см., например, Polu and Lowman, *Expert Opin. Biol. Ther.* 14:1049-1053, 2014).

В определенных вариантах реализации антитело, связывающее TNFR2, такое как описано в настоящем документе, имеет форму диатела. Диатела представляют собой мультимеры полипептидов, причем каждый полипептид содержит первый домен, содержащий связывающую область легкой цепи иммуноглобулина, и второй домен, содержащий связывающую область тяжелой цепи иммуноглобулина, при этом два домена связаны (например, пептидным линкером), но не могут ассоциировать друг с другом с образованием антигенсвязывающего сайта: антигенсвязывающие сайты образуются в результате ассоциации первого домена одного полипептида в мультимере со вторым доменом другого пептида в мультимере (WO94/13804).

Фрагмент dAb антитела состоит из домена VH (Ward, E. S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)).

Если необходимо применять биспецифические или полиспецифические антитела, то они могут представлять собой традиционные биспецифические антитела, которые могут быть получены разными способами (Holliger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993)), например, получены химическими методами или из гибридных гибридом, или могут представлять собой любой из фрагментов биспецифических антител,

упомянутых выше. Диатела и scFv могут быть сконструированы без Fc-области с применением только вариабельных доменов, что потенциально снижает эффекты антиидиотипической реакции.

Биспецифические диатела, в отличие от биспецифических полноразмерных антител, также могут быть особенно полезными, так как они могут быть легко сконструированы и экспрессированы в *E. coli*. Диатела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антител) с подходящей специфичностью связывания могут быть легко выбраны при помощи фагового дисплея (WO94/13804) из библиотек. Если одно плечо диатела должно оставаться неизменным, например, иметь специфичность, нацеленную на антиген X, то может быть получена библиотека, в которой варьируется другое плечо, и выбрано антитело соответствующей специфичности. Биспецифические полноразмерные антитела могут быть получены способом конструирования по типу «выступ-во-впадину» (J. B. B. Ridgeway et al., *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996).

В определенных вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, могут быть обеспечены в виде UniBody®. UniBody® представляет собой антитело IgG4 с удаленной шарнирной областью (см. GenMab Utrecht, The Netherlands; см., также, например, , заявку на патент США US20090226421). Указанная запатентованная технология получения антител обеспечивает формат стабильных мелких антител с ожидаемым более широким терапевтическим окном по сравнению с существующими форматами небольших антител. Антитела IgG4 считаются инертными и, таким образом, не взаимодействуют с иммунной системой. Полностью человеческие антитела IgG4 могут быть модифицированы путем удаления шарнирной области антитела с получением половинчатых фрагментов молекулы, имеющих отличительные свойства стабильности по сравнению с соответствующим интактным IgG4 (GenMab, Utrecht). Уменьшение молекулы IgG4 в два раза оставляет в UniBody® только один участок, который может связывать родственные антигены (например, мишени при заболевании), и UniBody®, таким образом, образует одновалентную связь только с одним сайтом в клеточных мишенях. Для определенных поверхностных антигенов раковых клеток указанное одновалентное связывание может не стимулировать рост раковых клеток, который может наблюдаться при применении бивалентных антител, имеющих такую же специфичность к антигену, и, следовательно, технология UniBody® может обеспечивать варианты лечения для некоторых типов рака, которые могут не поддаваться лечению традиционными антителами. Небольшой размер UniBody® может оказывать значительное благоприятное действие при лечении некоторых форм рака, обеспечивая лучшее распределение молекул по более крупным солидным опухолям и потенциально увеличивая эффективность.

В определенных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению могут иметь форму Nanobody®. Nanobody® кодируются отдельными генами и эффективно вырабатываются практически у всех прокариотических и эукариотических хозяев, например, *E. coli* (см., например, патент США №6765087), в плесневых грибах (например, *Aspergillus* или *Trichoderma*) и дрожжах (например, *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula*

или *Pichia* (см., например, патент США №6838254). Способ получения является масштабируемым, им были получены Nanobody® в количестве нескольких килограммов. Nanobody могут быть включены в состав готового к употреблению раствора, имеющего длительный срок хранения. Способ Nanoclone® (см., например, WO 06/079372) является запатентованным способом получения Nanobody к целевой мишени, основанным на автоматизированном высокопроизводительном отборе В-клеток.

В определенных вариантах реализации антитела к TNFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, являются гуманизированными. Это определение относится к химерной молекуле, в общем случае, полученной рекомбинантными способами, содержащей антигенсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина от видов, отличных от человека, и оставшуюся структуру иммуноглобулина в молекуле на основе структуры и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может содержать либо полные переменные домены, слитые с константными доменами, либо только CDR, привитые на соответствующие каркасные области в переменных доменах. Сайты связывания эпитопа могут иметь дикий тип или быть модифицированы одной или более аминокислотными заменами. Этот аспект удаляет константную область в качестве иммуногена у индивидуумов-людей, но сохраняет возможность иммунного ответа на чужеродную переменную область (LoBuglio, A. F. *et al.*, (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4220-4224; Queen *et al.*, *PNAS* (1988) 86:10029-10033; Riechmann *et al.*, *Nature* (1988) 332:323-327). Иллюстративные способы гуманизации антител к TNFR2, описанных в настоящем документе, включают способы, описанные в патенте США №7462697. Иллюстративные гуманизированные антитела согласно определенным вариантам реализации содержат гуманизированные последовательности, приведенные в **таблице Н1** и **таблице Н2**.

Другой подход нацелен не только на обеспечение выделенных у человека константных областей, но и на модификацию переменных областей, а также на их преобразование в форму, максимально возможно напоминающую человеческую. Известно, что переменные области как тяжелых, так и легких цепей содержат три определяющие комплементарность участка (CDR), которые изменяются в ответ на рассматриваемые эпитопы и определяют способность к связыванию, фланкированные четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными для данного вида и предположительно обеспечивают каркас для CDR. При получении нечеловеческих антител, нацеленных на конкретный эпитоп, переменные области могут быть «преобразованы» или «гуманизированы» путем прививки CDR, полученных из нечеловеческого антитела, на FR, присутствующую в модифицируемом антителе человека. Применение указанного подхода к разным антителам описано в Sato, K., *et al.*, (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L., *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M., *et al.*, (1988) *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A., *et al.*, (1991) *Protein Engineering* 4:773-778; Maeda, H., *et al.*, (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D., *et al.*, (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4181-4185; Tempest, P. R., *et al.*, (1991) *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S.,

et al., (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Carter, P., *et al.*, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-4289; и Co, M. S. *et al.*, (1992) *J Immunol* 148:1149-1154. В некоторых вариантах реализации гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело кролика, которое содержит все шесть CDR из антитела кролика). В некоторых вариантах реализации гуманизированные антитела содержат одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены по сравнению с исходным антителом, которые также называют одной или более CDR, «полученными из» одной или более CDR исходного антитела.

В определенных вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой химерные антитела. В данном отношении, химерное антитело состоит из антигенсвязывающего фрагмента антитела к TNFR2, функционально связанного или иным образом слитого с гетерологичной Fc-областью другого антитела. В определенных вариантах реализации гетерологичный Fc-домен получен у человека. В некоторых вариантах реализации гетерологичный Fc-домен может быть получен из Ig другого класса по сравнению с исходным антителом, включая IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. В дополнительных вариантах реализации гетерологичный Fc-домен может состоять из доменов CH2 и CH3 одного или более разных классов Ig. Как отмечалось выше в отношении гуманизированных антител, антигенсвязывающий фрагмент гуманизированного антитела к TNFR2 может содержать только одну или более CDR антител, описанных в настоящем документе (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR антител, описанных в настоящем документе), или может содержать полный вариабельный домен (VL, VH или оба указанных домена).

В определенных вариантах реализации антитело, связывающее TNFR2, содержит одну или более CDR антител, описанных в настоящем документе. В этом отношении, в некоторых случаях было показано, что можно проводить перенос только VHCDR3 антитела, сохраняя при этом требуемое специфическое связывание (Barbas *et al.*, *PNAS* (1995) 92: 2529-2533). См. также, McLane *et al.*, *PNAS* (1995) 92:5214-5218, Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116:2161-2162.

В Marks *et al.* (*Bio/Technology*, 1992, 10:779-783) описаны способы получения репертуаров вариабельных доменов антител, в которых консенсусные праймеры, нацеленные на 5'-конец участка вариабельного домена или расположенные рядом с ним, применяют совместно с консенсусными праймерами третьей каркасной области генов VH человека для обеспечения репертуара вариабельных доменов VH, в которых отсутствует CDR3. Маркс с коллегами также описывают возможный способ объединения указанного репертуара с CDR3 конкретного антитела. При помощи аналогичных способов последовательности, полученные из CDR3 антител, описанных в настоящем документе, могут быть перемешаны с репертуарами доменов VH или VL, не содержащих CDR3, и с перемешанными полными доменами VH или VL в комбинации с родственным доменом VL или VH для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который связывает TNFR2. Затем репертуар может быть отображен в подходящей системе-хозяине,

такой как система фагового дисплея, описанная в WO 92/01047, в результате чего можно выбирать подходящие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Репертуар может состоять по меньшей мере из примерно 10^4 отдельных элементов и даже больше на несколько порядков, например, примерно от 10^6 до 10^8 или 10^{10} или более элементов. Аналогичные способы перемешивания или комбинаторики также описаны Стеммером (Stemmer) (Nature, 1994, 370:389-391), который описывает данный способ в отношении гена β -лактамазы, но отмечает, что подход можно применять и для получения антител.

Дополнительной альтернативой является получение новых областей VH или VL, содержащих одну или более полученных из CDR последовательностей, описанных в настоящем документе, с применением случайного мутагенеза одного или более выбранных генов VH и/или VL для получения мутаций в варибельном домене в целом. Указанный способ описан Грэмом (Gram) с соавторами (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), который использовал ПЦР сниженной точности. Другой способ, который можно применять, заключается в нацеливании мутагенеза на участки CDR VH или VL генов. Указанные способы описаны Барбасом (Barbas) с соавторами (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) и Широм (Schier) с соавторами (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

В определенных вариантах реализации специфические VH и/или VL антител, описанных в настоящем документе, можно применять для скрининга библиотеки комплементарного варибельного домена для идентификации антител с желаемыми свойствами, такими как повышенная аффинность в отношении TNFR2. Указанные способы описаны, например, в in Portolano *et al.*, J. Immunol. (1993) 150:880-887; Clarkson *et al.*, Nature (1991) 352:624-628.

Другие способы также можно применять для комбинирования и сопоставления CDR для выявления антител, обладающих желаемой активностью связывания, такой как связывание с TNFR2. Например: в Klimka *et al.*, *British Journal of Cancer* (2000) 83: 252-260, описан способ скрининга с применением VL мыши и библиотеки VH человека, в которых сохранены CDR3 и FR4 из VH мыши. После получения антител проводили скрининг VH в отношении библиотеки VL человека для получения антител, которые связывали антиген. В Beiboer *et al.*, J. Mol. Biol. (2000) 296:833-849 описан способ скрининга с применением полной библиотеки тяжелых цепей мыши и легких цепей человека. После получения антител объединяли одну VL с библиотекой VH человека, в которых были сохранены CDR3. Получали антитела, способные связывать антиген. В Rader *et al.*, PNAS (1998) 95:8910-8915, описан способ, схожий со способом Бейбора (Beiboer) с соавторами, описанным выше.

Указанные описанные непосредственно выше способы как таковые сами по себе известны в данной области техники. Специалист, тем не менее, сможет применять указанные способы для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов согласно нескольким вариантам реализации, описанным в настоящем документе, с использованием стандартной методики в данной области техники.

В настоящем документе также описан способ получения антигенсвязывающего

домена антитела, специфического в отношении антигена TNFR2, включающий обеспечение посредством присоединения, делеции, замены или вставки одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности домена VH, представленного в настоящем документе, причем VH представляет собой вариант аминокислотной последовательности домена VH, необязательно объединение полученного таким образом домена VH с одним или более доменами VL, и исследование домена VH или комбинации или комбинаций VH/VL для выявления агента со специфическим связыванием или антигенсвязывающего домена антитела, специфического в отношении TNFR2, необязательно имеющего одно или более желаемых свойств. Домены VL могут содержать аминокислотную последовательность, которая по существу является такой, как представлено в настоящем документе. Можно применять аналогичный способ, в котором один или более вариантов последовательностей домена VL, описанного в настоящем документе, объединены с одним или более доменами VH.

Эпитоп, который «специфически связывается» или «предпочтительно связывается» (термины используют в настоящем документе взаимозаменяемо) антителом или полипептидом, является термином, хорошо известным в данной области техники, и способы определения указанного специфического или предпочтительного связывания также хорошо известны в данной области техники. Утверждается, что молекула характеризуется «специфическим связыванием» или «предпочтительным связыванием», если она взаимодействует или ассоциирует с конкретной клеткой или веществом с большей частотой, более высокой скоростью, на протяжении более продолжительного периода времени и/или с повышенной аффинностью по сравнению с альтернативными клетками или веществами. Антитело «специфически связывает» или «предпочтительно связывает» мишень, если оно связывает ее с повышенной аффинностью, авидностью, большей легкостью и/или на протяжении более продолжительного периода времени по сравнению с другими веществами. Например, антитело, которое специфически или предпочтительно связывает эпитоп TNFR2, представляет собой антитело, которое связывает один эпитоп TNFR2 с повышенной аффинностью, авидностью, большей легкостью и/или на протяжении более продолжительного периода времени по сравнению со связыванием с другими эпитопами TNFR2 или эпитопами, не относящимися к TNFR2. При изучении данного определения также следует понимать, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывает первую мишень, может специфически или предпочтительно связывать вторую мишень или не связывать ее. Таким образом, «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя и может включать) исключительное связывание. В общем случае, но не обязательно, описание связывания обозначает предпочтительное связывание.

Иммунологическое связывание, в общем случае, относится к такому типу нековалентных взаимодействий, которые происходят между молекулой иммуноглобулина и антигеном, в отношении которого иммуноглобулин обладает специфичностью, например, в качестве иллюстрации, но не ограничения, в результате электростатических, ионных,

гидрофильных и/или гидрофобных сил притяжения или отталкивания, стерических сил, образования водородной связи, ван-дер-ваальсовых сил и других взаимодействий. Сила или аффинность взаимодействий иммунологического связывания могут быть выражены при помощи константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где более низкое значение K_d соответствует более высокой аффинности. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов могут быть определены количественно способами, хорошо известными в данной области техники. Один из таких способов предусматривает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем указанные скорости зависят от концентраций партнеров, образующих комплекс, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые одинаково влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как «константа скорости ассоциации» (K_{acc}), так и «константа скорости диссоциации» ($K_{дисс}$) могут быть определены путем вычисления концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. Отношение $K_{дисс}/K_{acc}$ позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и, таким образом, равно константе диссоциации K_d . Общее описание см. в Davies *et al.* (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473.

Термин «иммунологически активный» при описании эпитопа, являющегося или «остающегося иммунологически активным», относится к способности антитела к TNFR2 связывать эпитоп в разных условиях, например, после обработки эпитопа в условиях восстановления и денатурации.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно некоторым вариантами реализации может представлять собой агент, который конкурентно связывает TNFR2 с любым антителом, описанным в настоящем документе, оба из которых (i) специфически связывают антиген и (ii) содержат домен VH и/или VL, описанный в настоящем документе, или содержат CDR3 VH, описанную в настоящем документе, или вариант любого из указанных агентов. Конкуренцию между антителами можно легко исследовать *in vitro*, например, при помощи ELISA и/или введения метки специфической репортерной молекулы в одно антитело, которое может быть обнаружено в присутствии других немеченных антител, что позволяет выявлять специфические антитела, которые связывают один эпитоп, или перекрывающийся эпитоп. Таким образом, в настоящем документе предложено специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(-ий) антигенсвязывающий сайт антитела человека, которое(-ый) конкурирует с антителом, описанным в настоящем документе, которое связывает TNFR2.

В данном отношении в настоящем документе термины «конкурирует с», «ингибирует связывание» и «блокирует связывание» (например, при описании ингибирования/блокирования связывания лиганда (например, ФНО- α) и/или контррецептора с TNFR2 или при описании ингибирования/блокирования связывания антитела к TNFR2 с TNFR2) используются взаимозаменяемо и включают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование лиганда и/или контррецептора с TNFR2 предпочтительно снижает или изменяет нормальный уровень или

тип передачи клеточного сигнала, который возникает при связывании лиганда и/или контррецептора с TNFR2 в отсутствие ингибирования или блокирования. Также предполагается, что ингибирование и блокирование включают любое поддающееся измерению снижение уровня связывания лиганда и/или контррецептора с TNFR2 при приведении в контакт с антителом к TNFR2, таким как описано в настоящем документе, по сравнению с лигандом, который не находится в контакте с антителом к TNFR2, например, блокирование связывания лиганда (например, ФНО- α) и/или контррецептора с TNFR2 по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Константные области иммуноглобулинов характеризуются меньшим разнообразием последовательностей по сравнению с вариабельными областями и отвечают за связывание ряда природных белков для индукции важных биохимических явлений. У человека существует пять разных классов антител, включая IgA (который включает подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (который включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM. Признаками, которые позволяют различать указанные классы антител, являются их константные области, хотя в V-области могут существовать и более тонкие различия.

Fc-область антитела взаимодействует с рядом рецепторов и лигандов Fc, придавая им совокупность важных функциональных возможностей, называемых эффекторными функциями. В одном из вариантов реализации антитело к TNFR2 содержит Fc-область. В случае IgG Fc-область содержит домены CH2 и CH3 Ig и N-концевой шарнирный участок, переходящий в CH2. Важным семейством Fc-рецепторов для класса IgG являются рецепторы Fc-гамма (Fc γ R). Указанные рецепторы являются посредниками для коммуникации антител и клеточной ветки иммунной системы (Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch *et al.*, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). У человека указанное семейство белков включает Fc γ RI (CD64), включая изоформы Fc γ RIa, Fc γ RIb и Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), включая изоформы Fc γ RIIa (включая аллотипы H131 и R131), Fc γ RIIb (включая Fc γ RIIb-1 и Fc γ RIIb-2) и Fc γ RIIc; и Fc γ RIII (CD16), включая изоформы Fc γ RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc γ RIIIb (включая аллотипы Fc γ RIIIb-NA1 и Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82:57-65). Указанные рецепторы, как правило, имеют внеклеточный домен, который является посредником для связывания с Fc, трансмембранную область и внутриклеточный домен, который может являться посредником для некоторых сигнальных событий в клетке. Эти рецепторы экспрессируются в разнообразных иммунных клетках, включая моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, большие гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, естественные клетки-киллеры (ЕК) и Т-клетки. Образование комплекса Fc/Fc γ R рекрутирует указанные эффекторные клетки к сайтам связанного антигена, что, как правило, приводит к сигнальным событиям в клетках и к важным последующим иммунным ответам, таким как высвобождение медиаторов воспаления, активация В-клеток, эндоцитоз, фагоцитоз и цитотоксическая атака.

Способность опосредовать цитотоксические и фагоцитарные эффекторные функции

представляет собой высокоактивный механизм, посредством которого антитела разрушают клетки-мишени. Опосредованную клетками реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcγR, распознают связанное антитело в клеточной мишени и затем вызывают лизис клеточной мишени, называют антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ) (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie *et al.*, 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766; Ravetch *et al.*, 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). Опосредованную клетками реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcγR, распознают связанное антитело к клеточной мишени и затем вызывают фагоцитоз клеточной мишени, называют антителозависимым клеточным фагоцитозом (АЗКФ). Все FcγR связывают одну область в Fc при N-конце домена Cg2 (CH2) и расположенном перед ним шарнирном участке. Структура указанного взаимодействия подробно охарактеризована (Sondermann *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 309:737-749), были разрешены несколько структур Fc человека, связанной с внеклеточным доменом FcγRIIIb человека (кодированный номер в PDB 1E4K) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406:267-273.) (кодированные номера в PDB 1IIS и 1IIX) (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477.)

Разные подклассы IgG имеют разную аффинность в отношении FcγR, причем IgG1 и IgG3, как правило, значительно лучше связывают рецепторы по сравнению с IgG2 и IgG4 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Все FcγR связывают одну область в IgG Fc, но с разной аффинностью: высокоаффинный связывающий рецептор FcγRI имеет K_d в отношении IgG1 10^{-8} M^{-1} , при этом низкоаффинные рецепторы FcγRII и FcγRIII, в общем случае, связываются при соответствующих значениях данного параметра 10^{-6} и 10^{-5} . Внеклеточные домены FcγRIIIa и FcγRIIIb идентичны на 96%; тем не менее, в FcγRIIIb отсутствует внутриклеточный сигнальный домен. Кроме того, в то время, как FcγRI, FcγRIIa/c и FcγRIIIa являются положительными регуляторами активации, инициируемой иммунным комплексом, характеризующимися наличием внутриклеточного домена, который содержит иммунорецепторный мотив активации тирозина (ITAM), FcγRIIIb содержит иммунорецепторный мотив ингибирования тирозина (ITIM) и, таким образом, является ингибиторным. Таким образом, указанные первыми рецепторы называют активирующими рецепторами, и FcγRIIIb называют ингибиторным рецептором. Рецепторы также отличаются профилем и уровнем экспрессии в разных иммунных клетках. Еще одним усложняющим аспектом является наличие ряда полиморфных форм FcγR в протеоме человека. Особенно важной полиморфной формой, имеющей клиническую значимость, является V158/F158 FcγRIIIa. IgG1 человека связывает аллотип V158 с более высокой аффинностью по сравнению с аллотипом F158. Было показано, что указанное различие в аффинности и, предположительно, в воздействии на АЗКЦ и/или АЗКФ является значимым фактором, определяющим эффективность ритуксимаба, антитела к CD20 (Ритуксан®, зарегистрированная торговая марка IDEC Pharmaceuticals Corporation). Пациенты с аллотипом V158 благоприятно отвечают на лечение ритуксимабом; тем не менее, пациенты с низкоаффинным аллотипом F158 плохо отвечают на лечение (Cartron *et al.*, 2002, *Blood*

99:754-758). Примерно 10-20% людей являются гомозиготными по V158/V158, 45% являются гетерозиготными при V158/F158, и 35-45% людей являются гомозиготными по F158/F158 (Lehrnbecher *et al.*, 1999, Blood 94:4220-4232; Cartron *et al.*, 2002, Blood 99:754-758). Таким образом, 80-90% людей плохо отвечают на лечение, то есть, у них имеется по меньшей мере один аллель F158 FcγRIIIa.

Fc-область также участвует в активации каскада комплемента. В классическом пути комплемента C1 связывается через субъединицы C1q с Fc-фрагментами IgG или IgM, образовавшим комплекс с антигеном(-ами). В определенных вариантах реализации модификации Fc-области содержат модификации, которые изменяют (либо усиливают, либо уменьшают) способность антитела, специфического в отношении TNFR2, описанного в настоящем документе, активировать систему комплемента (см., например, патент США №7740847). Для оценки активации комплемента можно проводить исследование комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) (см., например, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)).

Таким образом, в определенных вариантах реализации в настоящем изобретении предложены антитела к TNFR2, содержащие модифицированную Fc-область с измененными функциональными свойствами, такими как сниженная или повышенная активность КЗЦ, АЗКЦ или АЗКФ, или повышенная аффинность связывания со специфическим FcγR, или повышенный период полувыведения из сыворотки. Другие модифицированные Fc-области, рассматриваемые в настоящем документе, описаны, например, в выданных патентах США №7317091; 7657380; 7662925; 6538124; 6528624; 7297775; 7364731; опубликованных заявках на патент США US2009092599; US20080131435; US20080138344; и опубликованных международных заявках WO2006/105338; WO2004/063351; WO2006/088494; WO2007/024249.

Таким образом, в определенных вариантах реализации переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания слиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. В определенных вариантах реализации слияние проводят с константным доменом тяжелой цепи Ig, содержащим по меньшей мере часть шарнирных областей, C_H2 и C_H3. В некоторых случаях первая константная область тяжелой цепи (C_H1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, предпочтительно должна присутствовать по меньшей мере в одной из слитых форм. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при необходимости, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает повышенную гибкость при регулировании взаимного относительного содержания трех полипептидных фрагментов в тех вариантах реализации, в которых неравные отношения трех полипептидных цепей, применяемых при конструировании, обеспечивают оптимальный выход целевого биспецифического антитела. Тем не менее, допускается введение кодирующих последовательностей для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей при

равных отношениях приводит к высокому выходу или если отношения не имеют значительного влияния на выход требуемой комбинации цепей.

Антитела согласно настоящему изобретению (и их антигенсвязывающие фрагменты и варианты) также могут быть модифицированы для включения эпитопной метки или маркера, например, для применения для очистки или диагностических применений. В данной области техники известно множество линкерных групп для получения конъюгатов антител, включая, например, группы, описанные в патенте США №5208020 или Европейском патенте 0 425 235 B1 и в Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Линкерные группы включают дисульфидные группы, простые тиоэфирные группы, лабильные группы, неустойчивые к действию кислот, фотоллабильные группы, лабильные группы, неустойчивые к действию пептидазы, или лабильные группы, неустойчивые к действию эстеразы, такие как описано в указанных выше патентах, причем дисульфидные и простые тиоэфирные группы являются предпочтительными.

В некоторых вариантах реализации антитела, специфическое в отношении TNFR2, такое как описано в настоящем документе, может быть конъюгировано или функционально связано с другим агентом или терапевтическим соединением и называется в настоящем документе конъюгатом. Агент или терапевтическое соединение может представлять собой полипептидный агент, полинуклеотидный агент, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, цитокин, антиангиогенный агент, ингибитор тирозинкиназы, токсин, радиоизотоп или другой терапевтически активный агент. В настоящем документе описаны химиотерапевтические агенты, цитокины, антиангиогенные агенты, ингибиторы тирозинкиназы и другие терапевтические агенты, и все из упомянутых выше терапевтических агентов могут найти применение в качестве конъюгатов с антителами. Указанные конъюгаты можно применять, например, для нацеливания агента или соединения на участок действия, например, на опухоль или микроокружение опухоли, характеризующуюся(-еся) экспрессией TNFR2.

В некоторых вариантах реализации антитело конъюгировано или функционально связано с токсином, включая, но не ограничиваясь указанными, низкомолекулярные токсины, полипептиды, нуклеиновые кислоты и токсины с ферментной активностью бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты. Низкомолекулярные токсины включают, но не ограничиваются указанными, сапорин (Kuroda K, *et al.*, The Prostate 70:1286-1294 (2010); Lip, WL. *et al.*, 2007 Molecular Pharmaceutics 4:241-251; Quadros EV., *et al.*, 2010 Mol Cancer Ther; 9(11); 3033-40; Polito L., *et al.* 2009 British Journal of Haematology, 147, 710-718), калихеамицин, майтанзин (патент США №5208020), трихотен и CC1065. Токсины включают, но не ограничиваются указанными, РНКазу, гелонин, эндиины, рицин, абрин, токсин дифтерии, токсин холеры, гелонин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE40), токсин *Shigella*, токсин *Clostridium perfringens* и противовирусный белок лакноса.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с одной или более молекулами майтанзиноидов. Майтанзиноиды

представляют собой ингибиторы митоза, которые действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин впервые был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США №3896111). Впоследствии было обнаружено, что определенные микроорганизмы также вырабатывают майтанзиноиды, такие как майтанзинол и сложные эфиры С-3 майтанзинола (патент США №4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги описаны, например, в патентах США №4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; и 4371533. Иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноиды, и их терапевтическое применение описаны, например, в патенте США №5208020, 5416064 и в Европейском патенте EP 0 425 235 B1. В Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996), описаны иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1, связанный с моноклональным антителом C242, нацеленным на колоректальный рак человека. Было обнаружено, что конъюгат обладает высокой цитотоксичностью в отношении выращенных клеток рака толстой кишки и противоопухолевой активностью в исследовании роста опухоли *in vivo*.

Конъюгаты антитело-майтанзиноид получают путем химического связывания антитела с молекулой майтанзиноида в отсутствие значительного снижения биологической активности как антитела, так и молекулы майтанзиноида. Было показано, что в среднем 3-4 молекулы майтанзиноида, конъюгированные с одной молекулой антитела, эффективно усиливают цитотоксичность клеточных мишеней в отсутствие отрицательного влияния на функцию или растворимость антитела, при этом можно ожидать, что и одна молекула токсин/антитело будет усиливать цитотоксичность по сравнению с использованием «голового» антитела. Майтанзиноиды хорошо известны в данной области техники и могут быть синтезированы известными способами или выделены из природных источников. Подходящие майтанзиноиды описаны, например, в патенте США №5208020 и в других патентах и непатентных публикациях, упомянутых выше в настоящем документе. Предпочтительными майтанзиноидами являются майтанзинол и аналоги майтанзинола, модифицированные по ароматическому кольцу или другим положениям молекулы майтанзинола, такие как разные сложные эфиры майтанзинола.

Другой конъюгат, представляющий интерес, содержит антитело, конъюгированное с одной или более молекулами калихеамицина. Семейство антибиотиков калихеамицинов может создавать двухцепочечные разрывы ДНК при субпиколярных концентрациях. Также можно применять структурные аналоги калихеамицина (Hinman *et al.*, 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode *et al.*, 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (патент США №5714586; патент США №5712374; патент США №5264586; патент США №5773001). Аналоги доластатина 10, такие как ауристатин Е (АЕ) и монометилауристатин Е (ММАЕ), могут найти применение в качестве конъюгатов для антител, описанных в настоящем документе, или их вариантов (Doronina *et al.*, 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco *et al.*, 2003 Blood 102(4):1458-65). Подходящие токсины с ферментной активностью

включают, но не ограничиваются указанными, А-цепь токсина дифтерии, несвязывающие активные фрагменты токсина дифтерии, А-цепь экзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. См., например, РСТ WO 93/21232. В настоящем изобретении дополнительно рассматриваются варианты реализации, в которых конъюгат или слитый агент образуется из антитела, специфического в отношении TNFR2, описанного в настоящем документе, и соединения, обладающего нуклеолитической активностью, например, рибонуклеазы или ДНК-эндонуклеазы, такой как дезоксирибонуклеаза (ДНКазы).

В некоторых вариантах реализации антитело, описанное в настоящем документе, может быть конъюгировано или функционально связано с радиоизотопом с образованием радиоconъюгата. Для получения радиоconъюгатов антител доступны разные радиоактивные изотопы. Примеры включают, но не ограничиваются указанными, ^{90}Y , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At и ^{212}Bi .

Антитела, описанные в настоящем документе, могут в определенных вариантах реализации быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин (например, цитостатический или цитотоксический агент), терапевтическим агентом или радиоактивным элементом (например, с альфа-излучающими, гамма-излучающими элементами и т.д.). Цитотоксины или цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для клеток. Примеры включают паклитаксел/паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Одним из примеров цитотоксинов является сапорин (доступный в Advanced Targeting Systems, San Diego, CA). Терапевтические агенты включают, но не ограничиваются указанными, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, дакарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цисдихлордиаминплатину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (прежнее название дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Кроме того, антитело, специфическое в отношении TNFR2 (включая его функциональный фрагмент, такой как предложено в настоящем документе, такой как антигенсвязывающий фрагмент), может быть в определенных вариантах реализации конъюгировано с терапевтическими фрагментами, такими как радиоактивные материалы

или макроциклические хелатообразующие агенты, подходящие для конъюгирования ионов радиоактивных металлов. В определенных вариантах реализации макроциклический хелатообразующий агент представляет собой 1,4,7,10-тетраазаиклододекан-N, N', N'', N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), которая может быть присоединена к антителу через линкерную молекулу. Указанные линкерные молекулы общеизвестны в данной области техники и описаны в Denardo *et al.*, 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; и Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

В некоторых вариантах реализации антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (таким как стрептавидин) для применения в предварительном нацеливании на опухоль, при этом конъюгат антитело-рецептор вводят пациенту, после этого удаляют несвязанный конъюгат из кровотока с применением очищающего агента, а затем вводят «лиганд» (например, авидин), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, с радионуклеотидом). В некоторых вариантах реализации антитело конъюгировано или функционально связано с ферментом для проведения антителонаправленной ферментной пролекарственной терапии (ADEPT). ADEPT можно применять путем конъюгации или функционального связывания антитела с ферментом, активирующим пролекарство, который превращает пролекарство (например, пептидильный химиотерапевтический агент, см. PCT WO 81/01145) в активное противораковое лекарственное средство. См., например, PCT WO 88/07378 и патент США №4975278. Ферментный компонент иммуноконъюгата, подходящий для ADEPT, включает любой фермент, который может воздействовать на пролекарство таким образом, чтобы превращать его в более активную цитотоксическую форму. Ферменты, которые подходят для способа согласно указанным и схожим вариантам реализации, включают, но не ограничиваются указанными, щелочную фосфатазу, подходящую для превращения фосфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, подходящую для превращения сульфат-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндеаминазу, подходящую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза Serratia, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые подходят для превращения пептид-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, подходящие для превращения пролекарств, которые содержат D-аминокислотные заместители; ферменты, расщепляющие углеводы, такие как бета-галактозидаза и нейраминидаза, подходящие для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; бета-лактамазу, подходящую для превращения бета-лактамовых производных лекарственных средств в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как амидаза пенициллина V или амидаза пенициллина G, подходящие для превращения производных лекарственных средств, содержащих феноксиацетильную или фенилацетильную группу при атоме азота в амине, соответственно, в свободные лекарственные средства. В качестве альтернативы, антитела с ферментной активностью, также называемые в данной области

техники «абзимами», можно применять для превращения пролекарств в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, 1987, *Nature* 328: 457-458). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток.

Иммуноконъюгаты могут быть получены с применением разнообразных бифункциональных агентов сочетания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и соединения с двумя активными атомами фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Конкретные агенты сочетания включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP) для обеспечения дисульфидной связи. Линкер может представлять собой «отщепляемый линкер», способствующий высвобождению одного или более отщепляемых компонентов. Например, можно применять лабильный линкер, неустойчивый к действию кислот (*Cancer Research* 52: 127-131 (1992); патент США №5208020).

Другие модификации антител (и полипептидов) согласно изобретению также рассматривают в настоящем документе. Например, антитело может быть связано с одним из множества небелковых полимеров, например, с полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем, полиоксиалкиленами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антитело также может быть заключено внутри микрокапсул, полученных, например, способами коацервации или путем межфазной полимеризации (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно), коллоидных систем доставки лекарственных средств (например, липосом, альбуминовых микросфер, микроэмульсий, наночастиц и микрокапсул) или макроэмульсий. Указанные способы описаны в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16е издание, Oslo, A., ред., (1980).

«Носители» в настоящем документе включают фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в применяемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор для буферизации pH. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 (TWEEN™) полиэтиленгликоль (ПЭГ) и полоксамеры (PLURONIC™), и т.д.

Желаемые функциональные свойства антител к TNFR2 можно оценивать разными способами, известными специалистам, например, в исследованиях аффинности/связывания (например, исследованиях поверхностного плазмонного резонанса, конкурентного ингибирования); исследованиях цитотоксичности, исследованиях жизнеспособности клеток, исследованиях пролиферации или дифференцировки клеток, подавления роста раковых клеток и/или опухолей с применением моделей *in vitro* или *in vivo*. В других исследованиях можно проверять способность антител, описанных в настоящем документе, блокировать нормальные ответы, опосредованные TNFR2. Также можно исследовать эффективность антител, описанных в настоящем документе, *in vitro* и *in vivo*. Указанные исследования можно проводить с применением протоколов, хорошо известных специалистам (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (под ред.: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); или коммерчески доступных наборов.

В настоящем изобретении дополнительно предложена в определенных вариантах реализации выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такие как описано в настоящем документе, например, нуклеиновая кислота, которая кодирует CDR или домен VH или VL, такие как описано в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК. Указанные и схожие варианты реализации могут включать полинуклеотиды, кодирующие антитела, которые связывают TNFR2, как описано в настоящем документе. Термин «выделенный полинуклеотид» в настоящем документе обозначает полинуклеотид геномной кДНК или синтетического происхождения или некоторую их комбинацию, причем указанный выделенный полинуклеотид по своей природе (1) не ассоциирован со всем полинуклеотидом или частью полинуклеотида, в которой выделенный полинуклеотид встречается в природе, (2) связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в составе более крупной последовательности.

Термин «функционально связанный» означает, что компоненты, к которым применяется данный термин, находятся в связи, которая позволяет им выполнять характерные функции в подходящих условиях. Например, последовательность, регулирующая транскрипцию, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью белка, лигирована с ней, в результате чего обеспечивается экспрессия кодирующей последовательности белка в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регулирующих последовательностей.

Термин «регулирующая последовательность» в настоящем документе относится к полинуклеотидным последовательностям, которые могут влиять на экспрессию, процессирование или внутриклеточную локализацию кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы или функционально связаны. Природа указанных регулирующих последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах реализации последовательности, регулирующие транскрипцию, у прокариотов могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. В других конкретных вариантах реализации последовательности, регулирующие транскрипцию, у эукариотов могут включать промоторы, содержащие один или совокупность сайтов распознавания факторов транскрипции, последовательности, усиливающие транскрипцию, последовательности терминации транскрипции и последовательности полиаденилирования. В определенных вариантах реализации «регулирующие последовательности» могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнера по слиянию.

Термин «полинуклеотид» в настоящем документе обозначает одноцепочечные или двухцепочечные полимерные нуклеиновые кислоты. В определенных вариантах реализации нуклеотиды, содержащие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Указанные модификации включают модификации оснований, такие как бромурин, модификации рибозы, такие как арабинозид и 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидной связи, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат и фосфороамидат. Термин «полинуклеотид» в частности, включает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Термин «натуральные нуклеотиды» включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин «модифицированные нуклеотиды» включает нуклеотиды с группами модифицированного или замещенного сахара и т.д. Термин «олигонуклеотидные связи» включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфороаниладат, фосфороамидат и т.д. См., например, LaPlanche *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res., 14:9081; Stec *et al.*, 1984, J. Am. Chem. Soc., 106:6077; Stein *et al.*, 1988, Nucl. Acids Res., 16:3209; Zon *et al.*, 1991, Anti-Cancer Drug Design, 6:539; Zon *et al.*, 1991, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, стр. 87-108 (F. Eckstein, ред.), Oxford University Press, Oxford England; Stec *et al.*, патент США №5151510; Uhlmann and Peyman, 1990, Chemical Reviews, 90:543, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки для любых задач. Олигонуклеотид может включать детектируемую метку, которая позволяет обнаруживать олигонуклеотид или его гибридизацию.

Термин «вектор» используют для обозначения любой молекулы (например, нуклеиновой кислоты, плазмиды или вируса), применяемой для переноса кодирующей информации в клетку-хозяина. Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, который

подходит для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или контролируют экспрессию внедренных гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты. Экспрессия включает, но не ограничивается указанными, процессы, такие как транскрипция, трансляция и сплайсинг РНК, если присутствуют интроны.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что полинуклеотиды могут включать геномные последовательности, внегеномные и кодируемые плазмидой последовательности и сконструированные генные сегменты меньшего размера, которые экспрессируют белки, полипептиды, пептиды и т.д., или могут быть выполнены с возможностью их экспрессии. Указанные сегменты могут быть выделены из природных источников или синтетически модифицированы специалистом.

Специалисту также должно быть понятно, что полинуклеотиды могут быть одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными и могут представлять собой молекулы ДНК (геномной, кДНК или синтетической) или РНК. Молекулы РНК могут включать молекулы гРНК, которые содержат интроны и взаимно-однозначно соответствуют молекуле ДНК, и молекулы мРНК, которые не содержат интроны. Дополнительные кодирующие или не кодирующие последовательности могут, но не обязательно, присутствовать в полинуклеотиде согласно настоящему изобретению, и полинуклеотид может, но не обязательно, быть связан с другими молекулами и/или вспомогательными материалами. Полинуклеотиды могут содержать нативную последовательность или могут содержать последовательность, которая кодирует вариант или производное указанной последовательности.

Таким образом, согласно указанным и схожим вариантам реализации в настоящем изобретении также предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе. В определенных вариантах реализации предложены полинуклеотиды, которые содержат часть или полную полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, такое как описано в настоящем документе, и комплементы указанных полинуклеотидов.

В других схожих вариантах реализации полинуклеотидные варианты могут быть по существу идентичными полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело к TNFR2, описанное в настоящем документе. Например, полинуклеотид может представлять собой полинуклеотид, содержащий последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную, предпочтительно по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, идентичную последовательности полинуклеотида сравнения, такой как последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе, при определении способами, описанными в настоящем документе, (например, в анализе BLAST с использованием стандартных параметров, таких как описано ниже). Специалисту в данной области техники будет понятно, что указанные значения можно соответствующим образом регулировать для определения соответствующей идентичности белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, с учетом дегенерации кодонов,

сходства аминокислот, расположения рамки считывания и т.д.

Как правило, полинуклеотидные варианты могут содержать одну или более замен, вставок, делеций и/или инсерций, в результате чего предпочтительно аффинность связывания антитела, кодируемого полинуклеотидным вариантом, по существу не снижается по сравнению с антителом, кодируемым полинуклеотидной последовательностью, конкретным образом представленной в настоящем документе.

В определенных вариантах реализации полинуклеотидные фрагменты могут содержать или состоять по существу из смежных участков последовательности разной длины, идентичной или комплементарной последовательности, кодирующей антитело, такое как описано в настоящем документе. Например, предложены полинуклеотиды, которые содержат или состоят по существу из по меньшей мере примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 300, 400, 500 или 1000 или более смежных нуклеотидов последовательностей, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, а также все фрагменты промежуточной длины между указанными значениями. Должно быть очевидно, что «участки промежуточной длины» в данном контексте обозначают любую длину между представленными величинами, такую как 50, 51, 52, 53 и т.д.; 100, 101, 102, 103 и т.д.; 150, 151, 152, 153 и т.д.; включая все числовые значения в диапазонах 200-500; 500-1000 и т.д. Полинуклеотидная последовательность, такая как описано в настоящем документе, может быть удлинена при одном или обоих концах дополнительными нуклеотидами, не встречающимися в нативной последовательности. Указанная дополнительная последовательность может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов при любом конце полинуклеотида, кодирующего антитело, описанное в настоящем документе, или при обоих концах полинуклеотида, кодирующего антитело, описанное в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации предложены полинуклеотиды, которые могут гибридизоваться в условиях от умеренной до высокой жесткости с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенными в настоящем документе, или ее фрагментом или комплементарной ей последовательностью. Способы гибридизации хорошо известны в области молекулярной биологии. В качестве иллюстрации подходящие умеренно жесткие условия для исследования гибридизации полинуклеотида, такого как предложено в настоящем документе, с другими полинуклеотидами включают предварительное промывание в растворе 5 X SSC, 0,5% ДСН, 1,0 mM ЭДТА (pH 8,0); гибридизацию при 50°C-60°C, 5 X SSC, в течение ночи; последующую двукратное промывание при 65°C в течение 20 минут совместно с каждым из 2X, 0,5X и 0,2X SSC, содержащего 0,1% ДСН. Специалисту в данной области техники будет понятно, что жесткость гибридизации можно легко регулировать, например, изменяя содержание соли в растворе для гибридизации и/или температуру, при которой проводят гибридизацию. Например, в некоторых вариантах

реализации подходящие условия гибридизации высокой жесткости включают условия, описанные выше, за исключением того, что температуру гибридизации повышают, например, до 60°C-65°C или 65°C-70°C.

В определенных вариантах реализации полинуклеотиды, описанные выше, например, полинуклеотидные варианты, фрагменты и гибридизирующие последовательности, кодируют антитела, которые связывают TNFR2, или их антигенсвязывающие фрагменты. В определенных вариантах реализации указанные полинуклеотиды кодируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или CDR, которые связывают TNFR2 с аффинностью по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 70% и в определенных вариантах реализации по меньшей мере примерно 90%, а также последовательность антитела, конкретным образом представленную в настоящем документе. В дополнительных вариантах реализации указанные полинуклеотиды кодируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или CDR, которые связывают TNFR2 с более высокой аффинностью по сравнению с антителами, представленными в настоящем документе, например, которые связывают количественно с аффинностью по меньшей мере примерно 105%, 106%, 107%, 108%, 109% или 110%, а также последовательность антитела, конкретным образом представленную в настоящем документе.

Как описано в других разделах настоящего документа, определение трехмерных структур типовых полипептидов (например, вариантов антител, специфических в отношении TNFR2, таких как предложено в настоящем документе, например, белка антитела, содержащего антигенсвязывающий фрагмент, такой как предложено в настоящем документе) можно проводить стандартными методиками, такими как замена, присоединение, делеция или вставка одной или более аминокислот, причем можно проводить виртуальное моделирование для отдельных натуральных или ненатуральных аминокислот для определения возможного сохранения пространственных свойств частиц, описанных в настоящем изобретении, в полученном таким образом структурном варианте. Специалисту известно множество компьютерных программ для определения надлежащих аминокислотных замен (или соответствующих полинуклеотидов, кодирующих аминокислотную последовательность) в антителе, которые, например, позволяют сохранять аффинность или обеспечивать повышенную аффинность.

Полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, или их фрагменты, независимо от длины самой кодирующей последовательности, можно объединять с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигнальные последовательности полиаденилирования, дополнительные сайты рестрикционных ферментов, сайты множественного клонирования, другие кодирующие сегменты и т.д., таким образом, их общая длина может значительно варьироваться. Таким образом, предполагается, что можно применять фрагмент нуклеиновой кислоты практически любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничена легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК. Например,

иллюстративные полинуклеотидные сегменты с общей длиной примерно 10000, примерно 5000, примерно 3000, примерно 2000, примерно 1000, примерно 500, примерно 200, примерно 100, примерно 50 пар оснований и т.д. (включая все промежуточные длины) рассматривают в качестве подходящих.

При сравнении полинуклеотидных последовательностей две последовательности называют «идентичными», если последовательность нуклеотидов в двух последовательностях является одинаковой при их выравнивании для максимального соответствия, как описано ниже. Сравнение двух последовательностей, как правило, проводят путем сравнения последовательностей в сравниваемом участке для выявления и сравнения локальных областей сходства последовательностей. «Сравниваемый участок» в настоящем документе относится к сегменту из по меньшей мере примерно 20, как правило, от 30 до примерно 75, от 40 до примерно 50 смежных положений, по которому можно сравнивать последовательность с последовательностью сравнения, состоящей из такого же числа смежных положений, после оптимального выравнивания двух последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить при помощи программы Megalign™ в пакете Lasergene® биоинформатического программного обеспечения (DNASTAR, Inc., Madison, WI) с использованием параметров по умолчанию. В указанной программе реализованы несколько схем выравнивания, описанных в последующих материалах: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. в Dayhoff, M.O. (ред.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC том 5, прил. 3, стр. 345-358; Hein J., *Unified Approach to Alignment and Phylogenies*, стр. 626-645 (1990); *Methods in Enzymology* том 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., *CABIOS* 5:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., *CABIOS* 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., *Comb. Theor* 11:105 (1971); Santou, N. Nes, M., *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425 (1987); Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., *Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726-730 (1983).

В качестве альтернативы, оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить при помощи алгоритма локальной идентичности, описанного в Smith and Waterman, *Add. APL. Math* 2:482 (1981), алгоритма выравнивания для определения идентичности, описанного в Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), способами поиска идентичности, описанными в Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), программного исполнения указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), или методом подбора.

Одним из примеров алгоритмов, которые подходят для определения идентичности последовательностей и сходства последовательностей в процентах, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977), и Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), соответственно. BLAST и BLAST 2.0 можно

применять, например, с использованием параметров, описанных в настоящем документе, для определения процентной идентичности последовательностей двух или более полинуклеотидов. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным в Национальном центре биотехнологической информации. В одном из иллюстративных примеров можно вычислять совокупные индексы с использованием, в случае нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительные баллы за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафные баллы за несовпадающие остатки; всегда <0). Расширение области поиска совпадений слов в каждом направлении прекращают, если: совокупный индекс выравнивания выходит за пределы величины X относительно максимального значения; совокупный индекс снижается до нуля или менее; при выравнивании накапливаются один или более остатков с отрицательными индексами; или достигается конец какой-либо последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11 и ожидание (E) 10, и выравнивание по оценочной матрице BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)), (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

В определенных вариантах реализации «идентичность последовательности в процентах» определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в сравниваемом участке, состоящем по меньшей мере из 20 положений, где часть полинуклеотидной последовательности в сравниваемом участке может содержать вставки или делеции (т.е. пробелы) в количестве 20 процентов или менее, как правило, от 5 до 15 процентов или от 10 до 12 процентов по сравнению с последовательностями сравнения (которые не содержат вставки или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Идентичность в процентах вычисляют, определяя количество положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот встречаются в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, деля количество совпадающих положений на общее количество положений в последовательности сравнения (т.е. на размер участка) и умножая результаты на 100 для получения значения идентичности последовательностей в процентах.

Специалистам обычной квалификации в данной области техники должно быть понятно, что по причине дегенерации генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют антитело, такое как описано в настоящем документе. Некоторые из указанных полинуклеотидов имеют последовательность с минимальной идентичностью по сравнению с нуклеотидной последовательностью нативной или исходной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитела, которые связывают TNFR2. Тем не менее, полинуклеотиды, которые изменены из-за различий в частоте использования кодонов, явным образом рассматриваются в настоящем изобретении. В определенных вариантах реализации конкретно рассматривают последовательности с кодонами, оптимизированными для

экспрессии у млекопитающих.

В некоторых вариантах реализации для получения вариантов и/или производных антител, описанных в настоящем документе, можно применять подход мутагенеза, такой как сайт-специфический мутагенез. При помощи указанного подхода можно проводить специфические модификации полипептидной последовательности посредством мутагенеза базовых полинуклеотидов, которые их кодируют. Указанные способы обеспечивают простой подход для получения и исследования вариантов последовательностей, например, с учетом одного или более вышеуказанных факторов, путем встраивания одной или более измененных нуклеотидных последовательностей в полинуклеотид.

Сайт-специфический мутагенез позволяет получать мутанты благодаря использованию специфических олигонуклеотидных последовательностей, которые кодируют последовательность ДНК требуемой мутации, а также достаточного количества смежных нуклеотидов, для получения последовательности праймера с достаточным размером и сложностью последовательности для формирования стабильного дуплекса по обеим сторонам от границы области делеции. Можно применять мутации выбранной полинуклеотидной последовательности для улучшения, изменения, уменьшения, модификации или иного изменения свойств полинуклеотида как такового и/или изменения свойств, активности, композиции, стабильности или первичной последовательности кодируемого полипептида.

В определенных вариантах реализации авторы изобретения рассматривают мутагенез полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют антитело, описанное в настоящем документе, или его антигенсвязывающий фрагмент, для изменения одного или более свойств кодируемого полипептида, таких как аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или функция конкретной Fc-области или аффинность Fc-области в отношении конкретного FcγR. Способы сайт-специфического мутагенеза хорошо известны в данной области техники и широко используются для создания вариантов как полипептидов, так и полинуклеотидов. Например, сайт-специфический мутагенез часто применяют для изменения конкретной части молекулы ДНК. В указанных вариантах реализации применяют праймер длиной, как правило, от примерно 14 до примерно 25 нуклеотидов или около того, при этом изменяется от примерно 5 до примерно 10 остатков по обеим сторонам соединяемого участка последовательности.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в способах сайт-специфического мутагенеза часто применяют фаговый вектор, который существует как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме. Типовые векторы, подходящие для сайт-направленного мутагенеза, включают векторы, такие как фаг M13. Указанные фаги общедоступны в коммерческих источниках, и их применение, в общем случае, хорошо известно специалистам в данной области техники. Двухцепочечные плазмиды также традиционно применяют при сайт-направленном мутагенезе, в котором отсутствует стадия переноса гена, представляющего интерес, из плазмиды в фаг.

В целом, сайт-направленный мутагенез в соответствии с настоящим документом

проводят путем начального получения одноцепочечного вектора или плавления двух цепей двухцепочечного вектора, в последовательность которого включена последовательность ДНК, которая кодирует целевой пептид. Получают олигонуклеотидный праймер, содержащий целевую мутантную последовательность, в общем случае, посредством синтеза. Указанный праймер затем отжигают с одноцепочечным вектором и подвергают воздействию ДНК-полимеризирующих ферментов, таких как фрагмент Кленова полимеразы I *E. coli*, для завершения синтеза цепи, содержащей мутацию. Таким образом, образуется гетеродуплекс, в котором одна цепь кодирует исходную немутантную последовательность, и вторая цепь содержит целевую мутацию. Указанный гетеродуплексный вектор затем применяют для трансформации соответствующих клеток, таких как клетки *E. coli*, и отбирают клоны, которые включают рекомбинантные векторы, содержащие конструкт мутантной последовательности.

Получение вариантов последовательностей сегментов ДНК, кодирующих выбранный пептид, при помощи сайт-направленного мутагенеза обеспечивает средство получения потенциально подходящих частиц и не рассматривается как ограничивающее, так как существуют другие способы получения вариантов пептидных последовательностей и последовательностей ДНК, кодирующих их. Например, рекомбинантные векторы, кодирующие целевую пептидную последовательность, можно обрабатывать мутагенными агентами, такими как гидроксилламин, для получения вариантов последовательностей. Конкретные подробности, касающиеся указанных способов и протоколов описаны в работах Maloy *et al.*, 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; и Maniatis *et al.*, 1982, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки для указанной задачи.

В настоящем документе термин «способ олигонуклеотид-направленного мутагенеза» относится к матричным способам и опосредованному вектором размножению, которые приводят к повышению концентрации специфической молекулы нуклеиновой кислоты относительно ее начальной концентрации или к повышению уровня поддающегося обнаружению сигнала, такому как амплификация. В настоящем документе термин «способ олигонуклеотид-направленного мутагенеза» предназначен для обозначения способа, который включает матричное удлинение молекулы праймера. Термин «матричный способ» относится к синтезу молекулы нуклеиновой кислоты РНК или ДНК, в котором последовательность новой синтезируемой цепи нуклеиновой кислоты определяется хорошо известными правилами комплементарного спаривания оснований (см., например, Watson, 1987). Как правило, векторные методики включают встраивание фрагмента нуклеиновой кислоты в вектор ДНК или РНК, клональную амплификацию вектора и выделение амплифицированного фрагмента нуклеиновой кислоты. Примеры указанных методик предложены в патенте США №4237224, содержание которого конкретным образом включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки.

В другом подходе для получения полипептидных вариантов можно применять рекурсивную рекомбинацию последовательностей, как описано в патенте США №5837458.

В указанном подходе используют итеративные циклы рекомбинации и скрининга или отбора для «эволюции» отдельных полинуклеотидных вариантов, имеющих, например, повышенную аффинность связывания. В определенных вариантах реализации также предложены конструкторы в виде плазмид, векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, такой как описано в настоящем документе.

Во многих вариантах реализации нуклеиновые кислоты, кодирующие предложенное моноклональное антитело, вводят непосредственно в клетку-хозяина, и инкубируют клетку в условиях, достаточных для индукции экспрессии кодируемого антитела. Антитела согласно настоящему изобретению получают стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, в комбинации с последовательностями полипептида и нуклеиновой кислоты, предложенными в настоящем документе. Полипептидные последовательности можно применять для определения соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих конкретное антитело, описанное таким образом. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована для отражения конкретных «предпочтений» кодона для разных систем экспрессии согласно стандартным способам, хорошо известным специалистам в данной области техники.

Согласно определенным схожим вариантам реализации предложена рекомбинантная клетка-хозяин, которая содержит один или более конструкторов, таких как описано в настоящем документе; нуклеиновую кислоту, кодирующую любое антитело, CDR, домен VH или VL или его антигенсвязывающий фрагмент; и способ получения кодируемого продукта, включающий экспрессию из кодирующей нуклеиновой кислоты. Экспрессия можно быть эффективно обеспечена путем выращивания в соответствующих условиях рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих нуклеиновую кислоту. После получения посредством экспрессии антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно выделять и/или очищать любым подходящим способом, а затем применять при необходимости.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, такие как предложено в настоящем документе, и кодирующие молекулы нуклеиновых кислот и векторы, можно выделять и/или очищать, например, из формы, в которой они присутствуют в естественных условиях, по существу в чистой или гомогенной форме или, в случае нуклеиновой кислоты, в отсутствие или по существу в отсутствие нуклеиновой кислоты или генов, которые по происхождению отличаются от последовательности, кодирующей полипептид с целевой функцией. Нуклеиновая кислота может содержать ДНК или РНК и может быть полностью или частично синтетической. Упоминание нуклеотидной последовательности, такой как представлено в настоящем документе, включает молекулу ДНК с указанной последовательностью и включает молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой U замещен на T, если по контексту не требуется иное.

Хорошо известны системы клонирования и экспрессии полипептида во множестве

разных клеток-хозяев. Подходящие клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, дрожжи и бакуловирусные системы. Клеточные линии млекопитающих, доступные в данной области техники для экспрессии гетерологичного полипептида, включают клетки яичника китайского хомяка, клетки HeLa, клетки почки новорожденных хомяков, клетки меланомы мыши NSO и многие другие. Распространенным предпочтительным бактериальным хозяином является *E. coli*.

Экспрессия антител и антигенсвязывающих фрагментов в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, хорошо известна в данной области техники. См., например, Pluckthun (Bio/Technology 9: 545-551, 1991). Экспрессия в культуре эукариотических клеток также доступна специалистам в данной области техники в качестве варианта получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, см. недавние обзоры, например, Ref, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J. J. *et al.* (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.

Могут быть выбраны или сконструированы подходящие векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные последовательности, полиаденилирующие последовательности, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности, в соответствующих случаях. Векторы могут представлять собой плазмиды, вирусные, например, фаги или фагмиды, в соответствующих случаях. Более подробное описание см., например, в Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2e издание, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Множество известных способов и протоколов для обработки нуклеиновой кислоты, например, при получении конструкторов на основе нуклеиновых кислот, мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов, и анализа белков подробно описаны в Current Protocols in Molecular Biology, второе издание, Ausubel *et al.* ред., John Wiley & Sons, 1992, или в последующих обновленных версиях.

Термин «клетка-хозяин» используют для описания клетки, в которую была введена или в которую может быть введена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая одно или более из описанных в настоящем документе антител, и которая дополнительно экспрессирует или может экспрессировать выбранный ген, представляющий интерес, такой как ген, кодирующий любое описанное в настоящем документе антитело. Термин включает потомство родительской клетки, независимо от того, является ли потомство идентичным по морфологии или по генетическому составу исходной родительской клетки, при условии наличия выбранного гена. Соответственно, также рассматривается способ, включающий введение указанной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Для введения можно применять любой доступный способ. Для эукариотических клеток подходящие способы могут включать кальций-фосфатную трансфекцию, ДЭАЭ-декстран, электропорацию, липосомальную трансфекцию и трансдукцию с применением ретровируса или другого вируса, например, осповакцины, или, в случае клеток насекомых, бакуловируса. Для бактериальных клеток подходящие способы могут включать трансформацию с обработкой

хлоридом кальция, электропорацию и трансфекцию с применением бактериофага. Введение можно проводить, вызывая или обеспечивая экспрессию из нуклеиновой кислоты, например, путем выращивания клеток-хозяев в условиях экспрессии гена. В некоторых вариантах реализации нуклеиновую кислоту встраивают в геном (например, в хромосому) клетки-хозяина. Встраивание можно стимулировать, включая последовательности, которые способствуют рекомбинации с геномом, в соответствии со стандартными способами.

В настоящем изобретении также предложен, в определенных вариантах реализации, способ, который включает применение конструкта, такого как указано выше, в экспрессирующей системе для экспрессии конкретного полипептида, такого как антитело, специфическое в отношении TNFR2, такое как описано в настоящем документе. Термин «трансдукция» используют для описания переноса генов из одной бактерии в другую, как правило, фагом. «Трансдукция» также относится к приобретению и переносу эукариотических клеточных последовательностей ретровирусами. Термин «трансфекция» используют для описания захвата чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, и клетка «трансфицируется», если экзогенная ДНК вводится внутрь клеточной мембраны. Ряд способов трансфекции хорошо известен в данной области техники и описан в настоящем документе. См., например, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis *et al.*, 1986, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier; и Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Указанные способы можно применять для введения одного или более экзогенных фрагментов ДНК в подходящие клетки-хозяева.

Термин «трансформация» в настоящем документе относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка трансформируется, если она была модифицирована и содержит новую ДНК. Например, клетка трансформируется, если она генетически модифицируется по сравнению с нативным состоянием. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физического встраивания в хромосому клетки или может временно сохраняться в виде эпизомного элемента без репликации, или может независимо реплицироваться в виде плазмиды. Клетку считают стабильно трансформированной, если ДНК реплицируется при делении клетки. Термин «встречающийся в природе» или «нативный» при использовании в отношении биологических материалов, таких как молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды, клетки-хозяева и т.д., относится к материалам, которые встречаются в природе и не подвергаются обработке человеком. Аналогично, «не встречающийся в природе» или «ненативный» в настоящем документе относится к материалу, который не встречается в природе или который был структурно модифицирован или синтезирован человеком.

Термины «полипептид», «белок» и «пептид», и «гликопротеин» используются взаимозаменяемо и обозначают аминокислотный полимер, не ограниченный какой-либо конкретной длиной. Термин не исключает модификации, такие как миристоилирование,

сульфирование, гликозилирование, фосфорилирование и присоединение или делеция сигнальных последовательностей. Термины «полипептид» или «белок» обозначают одну или более цепей аминокислот, где каждая цепь содержит аминокислоты, ковалентно связанные пептидными связями, и где указанный полипептид или белок может содержать совокупность цепей, нековалентно и/или ковалентно связанных друг с другом пептидными связями, имеющую последовательность нативных белков, то есть белков, вырабатываемых встречающимися в природе и, в частности, нерекомбинантными клетками, или генетически сконструированными или рекомбинантными клетками, и содержат молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, вставки, и/или замены одной или более аминокислот нативной последовательности. Термины «полипептид» и «белок», в частности, включают антитела, которые связывают TNFR2, согласно настоящему изобретению, или последовательности, которые имеют делеции, вставки и/или замены одной или более аминокислот антитела к TNFR2. Таким образом, «полипептид» или «белок» может содержать одну (называется «мономерным») или совокупность (называется «мультимерным») аминокислотных цепей.

Термин «выделенный белок» при упоминании в настоящем документе означает, что данный белок (1) не содержит по меньшей мере некоторые другие белки, с которыми он, как правило, встречается в природе, (2) по существу не содержит другие белки из того же источника, например, от того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида, (4) отделен по меньшей мере примерно от 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которыми он ассоциирован в природе, (5) не ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с частями белка, с которыми «выделенный белок» ассоциирован в природе, (6) функционально ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не ассоциирован в природе, или (7) не встречается в природе. Указанный выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК, или может иметь синтетическое происхождение, или любую их комбинацию. В определенных вариантах реализации выделенный белок по существу не содержит белки или полипептиды, или другие примеси, которые присутствуют в его естественном окружении и которые могут препятствовать его применению (терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или иному).

Термин «полипептидный фрагмент» относится к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, который имеет делецию при amino-конце, делецию при карбокси-конце и/или внутреннюю делецию или замену по сравнению с встречающимся в природе или полученным рекомбинантными способами полипептидом. В определенных вариантах реализации полипептидный фрагмент может содержать аминокислотную цепь длиной по меньшей мере от 5 до примерно 500 аминокислот. Следует понимать, что в определенных вариантах реализации длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100,

110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Особенно подходящие полипептидные фрагменты включают функциональные домены, включая антигенсвязывающие домены или фрагменты антител. В случае антитела к TNFR2 подходящие фрагменты включают, но не ограничиваются указанными, CDR-участок, в частности CDR3-участок тяжелой или легкой цепи; вариабельную область тяжелой или легкой цепи; часть цепи антитела или только его вариабельную область, включающую два CDR, и т.д.

Полипептиды могут содержать сигнальную (или лидерную) последовательность при N-конце белка, которая обеспечивает котрансляционную или послетрансляционную регуляцию переноса белка. Любые аминокислотные последовательности полипептида, предложенные в настоящем документе, которые включают сигнальный пептид, также рассматривают для любого применения, описанного в настоящем документе, в отсутствие указанного сигнального или лидерного пептида. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что сигнальный пептид, как правило, расщепляется во время процессирования и не включается в белок активного антитела. Полипептид также может быть слит внутри рамки или конъюгирован с линкером или другой последовательностью для облегчения синтеза, очистки или идентификации полипептида (например, поли-His) или для усиления связывания полипептида с твердой подложкой.

Последовательность пептидного линкера/спейсера также можно применять для разнесения нескольких полипептидных компонентов на расстояние, достаточное для того, чтобы каждый полипептид укладывался во вторичные и/или третичные структуры, по мере необходимости. Указанная последовательность пептидного линкера может быть включена в слитый полипептид стандартными способами, хорошо известными в данной области техники.

Определенные последовательности пептидных спейсеров могут быть выбраны, например, на основании: (1) способности принимать гибкую удлиненную конформацию; (2) неспособности образовывать вторичную структуру, которая может взаимодействовать с функциональными эпитопами первого и второго полипептидов; и/или (3) отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могут взаимодействовать с функциональными эпитопами полипептида.

В одном иллюстративном варианте реализации последовательности пептидного спейсера содержат, например, остатки Gly, Asn и Ser. Другие практически нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть включены в последовательность спейсера.

Другие аминокислотные последовательности, которые можно применять в качестве спейсеров, включают последовательности, описанные в Maratea *et al.*, *Gene* 40:39 46 (1985); Murphy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258 8262 (1986); патенте США №4935233 и патенте США №4751180.

Другие иллюстративные спейсеры могут включать, например, Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (SEQ ID NO:324) (Chaudhary *et al.*, 1990, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070) и Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (SEQ ID NO:325) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

В некоторых вариантах реализации последовательности спейсеров не требуются, если первый и второй полипептиды содержат области из заменимых аминокислот при N-конце, которые можно применять для разделения функциональных доменов и предотвращения стерического отрицательного воздействия. Две кодирующие последовательности могут быть слиты непосредственно без какого-либо спейсера или с применением гибкого полилинкера, состоящего, например, из пентамера Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:326), используемого от 1 до 3 раз. Указанный спейсер применяли при конструировании одноцепочечных антител (scFv) путем встраивания между VH и VL (Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5979-5883).

Пептидный спейсер в определенных вариантах реализации выполнен с возможностью обеспечения надлежащего взаимодействия двух бета-листов, формирующих переменную область одноцепочечного антитела.

В определенных вариантах реализации пептидный спейсер имеет длину от 1 до 5 аминокислот, от 5 до 10 аминокислот, от 5 до 25 аминокислот, от 5 до 50 аминокислот, от 10 до 25 аминокислот, от 10 до 50 аминокислот, от 10 до 100 аминокислот или в любом промежуточном диапазоне между указанными количествами аминокислот. В некоторых вариантах реализации длина пептидного спейсера составляет примерно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислот.

Рассматривается(-ются) модификация(-и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Например, варианты аминокислотных последовательностей антитела могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в полинуклеотид, который кодирует антитело, или его цепь, или путем синтеза пептида. Указанные модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Можно применять любую комбинацию делеции, вставки и замены для получения конечного антитела при условии, что конечный конструкт обладает желаемыми характеристиками (например, высокой аффинностью связывания с TNFR2). Аминокислотные изменения также могут изменять посттрансляционные процессы в антителе, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования. Любые изменения и модификации, описанные выше для полипептидов согласно настоящему изобретению, могут быть включены в антитела согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении предложены варианты антител, описанных в настоящем документе. В определенных вариантах реализации указанные варианты антител или антигенсвязывающие фрагменты или их CDR связывают TNFR2 с аффинностью по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 70% и в определенных вариантах реализации по меньшей мере примерно 90%, а также последовательность антитела,

конкретно представленную в настоящем документе. В дополнительных вариантах реализации указанные варианты антител или антигенсвязывающие фрагменты или их CDR связывают TNFR2 с более высокой аффинностью по сравнению с антителами, представленными в настоящем документе, например, которые связывают количественно с аффинностью по меньшей мере примерно 105%, 106%, 107%, 108%, 109% или 110%, а также последовательность антитела, конкретно представленную в настоящем документе.

Определение трехмерных структур типовых полипептидов (например, варианта антител, специфических в отношении TNFR2, таких как предложено в настоящем документе, например, белка антитела, содержащего антигенсвязывающий фрагмент, такой как предложено в настоящем документе), можно проводить традиционными способами, такими как замена, присоединение, делеция или вставка одной или более аминокислот, причем можно проводить виртуальное моделирование для отдельных натуральных или ненатуральных аминокислот для определения возможного сохранения пространственных свойств частиц, описанных в настоящем изобретении, в полученном таким образом структурном варианте. См., например, Donate et al., 1994 *Prot. Sci.* 3:2378; Bradley et al., *Science* 309: 1868-1871 (2005); Schueler-Furman et al., *Science* 310:638 (2005); Dietz et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103:1244 (2006); Dodson et al., *Nature* 450:176 (2007); Qian et al., *Nature* 450:259 (2007); Raman et al. *Science* 327:1014-1018 (2010). Некоторые дополнительные неограничивающие примеры компьютерных алгоритмов, которые можно применять для указанных и схожих вариантов реализации, например, для рационального дизайна антигенсвязывающих доменов антител, специфических в отношении TNFR2, таких как предложено в настоящем документе, включают VMD, которая представляет собой программу молекулярной визуализации для отображения, анимации и анализа крупных биомолекулярных систем с использованием 3-D графики и встроенных сценариев (см. веб-сайт группы теоретической и вычислительной биофизики Университета штата Иллинойс в Урбана-Шампань ks.uiuc.edu/Research/vmd/). В данной области техники известно множество других компьютерных программ, которые доступны специалистам и позволяют определять атомные размеры на основе пространственных моделей (радиусы Ван-дер-Ваальса) минимальных энергетических конформаций; GRID, которая нацелена на определение областей с высокой аффинностью в отношении разных химических групп для улучшения тем самым связывания, поиск по методу Монте-Карло, в котором вычисляют математическую модель выравнивания, и CHARMM (Brooks et al. (1983) *J. Comput. Chem.* 4:187-217) и AMBER (Weiner et al (1981) *J. Comput. Chem.* 106: 765), которые оценивают вычисления силовых полей, и анализ (также см., Eisenfield et al. (1991) *Am. J. Physiol.* 261:C376-386; Lybrand (1991) *J. Pharm. Belg.* 46:49-54; Froimowitz (1990) *Biotechniques* 8:640-644; Burbam et al. (1990) *Proteins* 7:99-111; Pedersen (1985) *Environ. Health Perspect.* 61:185-190; и Kini et al. (1991) *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9:475-488). Также доступен ряд соответствующих вычислительных компьютерных программ, например, производства Schrödinger (Munich, Germany).

В некоторых вариантах реализации антитела к TNFR2 и их гуманизированные

версии получают из моноклональных антител кролика и, в частности, получают с применением технологии APXiMAV™. Указанные антитела являются предпочтительными, так как они требуют минимальных модификаций последовательностей и тем самым облегчают сохранение функциональных свойств после гуманизации с применением технологии гуманизации, контролируемой мутационной линией (MLG) (см., например, патент США №7462697). Таким образом, иллюстративные способы получения антител к TNFR2 согласно настоящему изобретению включают технологию с применением моноклональных антител кролика APXiMAV™, описанную, например, в патентах США №5675063 и 7429487. В этом отношении в определенных вариантах реализации антитела к TNFR2 согласно изобретению получают у кроликов. В конкретных вариантах реализации бессмертный В-лимфоцит, полученный у кролика, способный к слиянию со спленоцитом кролика или периферическим В-лимфоцитом, применяют для получения гибридной клетки, которая вырабатывает антитело. Бессмертный В-лимфоцит не экспрессирует эндогенную тяжелую цепь иммуноглобулина на поддающемся обнаружению уровне и может содержать, в определенных вариантах реализации, ген, кодирующий измененную тяжелую цепь иммуноглобулина.

Композиции и способы применения

В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие антитела, специфические в отношении TNFR2, или их антигенсвязывающие фрагменты, и введение указанной композиции для разных терапевтических задач, включая лечение рака, воспалительных и аутоиммунных заболеваний и других заболеваний.

Введение антител, специфических в отношении TNFR2, описанных в настоящем документе, в чистом виде или в подходящей фармацевтической композиции можно проводить в рамках любого из принятых режимов введения агентов для реализации схожих применений. Фармацевтические композиции могут быть получены путем объединения антитела или композиции, содержащей антитело, с соответствующим физиологически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом, и могут быть включены в состав препаратов в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной форме, такой как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекционные препараты, ингаляционные препараты, гели, микросферы и аэрозоли. Кроме того, другие фармацевтически активные ингредиенты (включая другие противораковые агенты, такие как описано в других разделах настоящего документа) и/или подходящие вспомогательные вещества, такие как соли, буферы и стабилизаторы, могут, но не обязательно, присутствовать в композиции. Введение можно проводить при помощи ряда различных способов, включая пероральный, парентеральный, назальный, внутривенный, внутрикожный, подкожный или местный. Предпочтительные режимы введения зависят от характера состояния, которое лечат или предотвращают. Количество, которое после введения уменьшает, подавляет, предотвращает или задерживает прогрессирование и/или метастазы рака, рассматривают как эффективное.

В определенных вариантах реализации вводимое количество является достаточным

для обеспечения регрессии опухоли, на что указывает статистически значимое уменьшение количества жизнеспособной опухоли, например, уменьшение по меньшей мере на 50% опухолевого образования, или изменение (например, уменьшение на статистически значимом уровне) размеров по результатам сканирования.

Точная дозировка и продолжительность лечения зависят от заболевания, которое лечат, и могут быть определены эмпирически с применением известных протоколов исследования или путем исследования композиций в модельных системах, известных в данной области техники, и экстраполяции на основе их результатов. Также можно проводить контролируемые клинические испытания. Дозировки также могут варьироваться в зависимости от тяжести состояния, которое облегчают. Фармацевтическую композицию, в общем случае, получают и вводят для обеспечения терапевтически полезного эффекта и минимизации при этом нежелательных побочных эффектов. Композицию можно вводить один раз или можно разделять на несколько меньших доз, которые вводят с временными интервалами. Для любого конкретного субъекта конкретные режимы введения могут быть скорректированы со временем в соответствии с потребностями индивидуума.

Композиции, содержащие антитела, специфические в отношении TNFR2, можно вводить отдельно или в комбинации с другими известными способами лечения рака, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т.д. Композиции также можно вводить в комбинации с антибиотиками.

Типовые способы введения указанных и схожих фармацевтических композиций, таким образом, включают без ограничений пероральный, местный, чрескожный, ингаляционный, парентеральный, подязычный, трансбуккальный, ректальный, внутривагинальный, интравитреальный и интраназальный. Термин «парентеральный» в настоящем документе включает подкожные инъекции, способы внутривенной, внутримышечной, внутригрудной инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции согласно определенным вариантам реализации получены с возможностью обеспечения биодоступности содержащихся в них активных ингредиентов при введении композиции пациенту. Композиции, которые можно вводить субъекту или пациенту, могут принимать одну или более стандартных лекарственных форм, причем, например, таблетка может представлять собой стандартную лекарственную форму с разовой дозировкой, и контейнер для описанного в настоящем документе антитела, специфического в отношении TNFR2, в виде аэрозоля может содержать совокупность стандартных лекарственных форм. Фактические способы получения указанных лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области техники; например, см. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20е издание (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Вводимая композиция в любом случае будет содержать терапевтически эффективное количество антитела согласно настоящему изобретению для лечения заболевания или состояния, представляющего интерес, в соответствии с базовыми идеями, изложенными в настоящем документе.

Фармацевтическая композиция может иметь форму твердого вещества или жидкости. В одном из вариантов реализации носитель(-и) является(-ются) дисперсным(-и), таким образом, композиции, например, имеют форму таблетки или порошка. Носитель(-и) может(могут) быть жидким(-и), при этом композиции представляют собой, например, масло для перорального применения, жидкость для инъекции или аэрозоль, который подходит, например, для ингаляционного введения. Если предполагается пероральное введение фармацевтической композиции, то она предпочтительно присутствует либо в твердой, либо в жидкой форме, причем полутвердые, полужидкие формы, суспензии и гели включены в определение форм, которые рассматривают в настоящем документе в качестве либо твердых веществ, либо жидкостей.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическую композицию можно включать в состав порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, капсулы-имплантата и т.д. Указанная твердая композиция, как правило, может содержать один или более инертных разбавителей или пищевых носителей. Кроме того, могут присутствовать одно или более из следующих веществ: связывающие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательные вещества, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, Примогель, кукурузный крахмал и т.д.; смазывающие вещества, такие как стеарат магния или Стеротекс; глиданты, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; вкусоароматическая добавка, такая как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и краситель. Если фармацевтическая композиция имеет форму капсулы, например, желатиновой капсулы, она может содержать помимо материалов указанных выше типов жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Фармацевтическая композиция может иметь форму жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки путем инъекции в качестве двух примеров. Определенные композиции, если они предназначены для перорального введения, содержат помимо предложенных соединений одно или более из подсластителя, консервантов, окрашивающего вещества/красителя и усилителя вкуса. В композицию, предназначенную для введения путем инъекции, могут быть включены одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергирующего агента, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции, которые могут иметь форму растворов, суспензий или другую схожую форму, могут включать один или более из следующих адъювантов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут выступать в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли,

глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Физиологический раствор является одним из примеров адьюванта. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Жидкая фармацевтическая композиция, предназначенная либо для парентерального, либо для перорального введения, должна содержать такое количество антитела, специфического в отношении TNFR2, описанного в настоящем документе, которое позволит получить подходящую дозировку. Как правило, указанное количество составляет по меньшей мере 0,01% антитела в композиции. Указанное количество, если оно предназначено для перорального введения, может варьироваться от 0,1 до примерно 70% от массы композиции. Определенные фармацевтические композиции для перорального применения содержат от примерно 4% до примерно 75% антитела. В определенных вариантах реализации фармацевтические композиции и препараты получают таким образом, чтобы стандартная парентеральная лекарственная форма содержала от 0,01 до 10% по массе антитела перед разбавлением.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для местного введения, и в этом случае носитель может подходящим образом содержать основу раствора, эмульсии, мази или геля. Основа, например, может содержать одно или более из следующего: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, и эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в фармацевтической композиции для местного введения. Композиция, если она предназначена для чрескожного введения, может включать чрескожный пластырь или устройство для ионтофореза. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения в виде, например, суппозитория, который может плавиться в прямой кишке и высвобождать лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистую основу в качестве подходящего нераздражающего вспомогательного вещества. Указанные основы включают без ограничений ланолин, масло какао и полиэтиленгликоль.

Фармацевтическая композиция может включать разные материалы, которые модифицируют физическую форму твердой или жидкой стандартной лекарственной формы. Например, композиция может включать материалы, которые образуют оболочку покрытия вокруг активных ингредиентов. Материалы, которые образуют оболочку покрытия, как правило, являются инертными и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других агентов для кишечнорастворимых покрытий. В качестве альтернативы, активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Фармацевтическая

композиция в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывает антитело и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие агенты, которые могут действовать подобным образом, включают другие моноклональные или поликлональные антитела, один или более белков или липосому. Фармацевтическая композиция может состоять по существу из стандартных лекарственных форм, которые можно вводить в виде аэрозоля. Термин «аэрозоль» используют для обозначения ряда систем: от систем, имеющих коллоидную природу, до систем, состоящих из стойких к давлению упаковок. Доставку можно проводить при помощи сжиженного или сжатого газа или подходящей системы насосов, которая распределяет активные ингредиенты. Аэрозоли могут доставляться в однофазных, двухфазных или трехфазных системах для доставки активного(-ых) ингредиента(-ов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, вложенные контейнеры и т.д., которые вместе могут составлять набор. Специалист обычной квалификации в данной области техники, не проводя излишнюю экспериментальную работу, сможет определить предпочтительные аэрозоли.

Фармацевтические композиции могут быть получены при помощи методики, хорошо известной в области фармацевтики. Например, фармацевтическая композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть получена путем объединения композиции, которая содержит антитело, специфическое в отношении TNFR2, описанное в настоящем документе, и необязательно одно или более из солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой для получения раствора. Можно добавлять поверхностно-активное вещество для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с композицией антитела для облегчения таким образом растворения или образования гомогенной суспензии антитела в водной системе доставки.

Композиции можно вводить в терапевтически эффективном количестве, которое может варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая активность конкретного применяемого соединения (например, антитела, специфического в отношении TNFR2); метаболическую стабильность и продолжительность действия соединения; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; режим и время введения; скорость выведения; комбинацию лекарственных средств; тяжесть конкретного нарушения или состояния; и субъекта, проходящего терапию. В общем случае, терапевтически эффективная дневная доза составляет (для млекопитающего с массой тела 70 кг) от примерно 0,001 мг/кг (т.е. 0,07 мг) до примерно 100 мг/кг (т.е. 7,0 г); предпочтительно, терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего с массой тела 70 кг) от примерно 0,01 мг/кг (т.е. 0,7 мг) до примерно 50 мг/кг (т.е. 3,5 г); более предпочтительно, терапевтически эффективная доза составляет (для млекопитающего с массой тела 70 кг) от примерно 1 мг/кг (т.е. 70 мг) до примерно 25 мг/кг (т.е. 1,75 г).

Композиции, содержащие антитела, специфические в отношении TNFR2, согласно настоящему изобретению, также можно вводить одновременно с, до или после введения

одного или более других терапевтических агентов. Указанная комбинированная терапия может включать введение одного фармацевтического лекарственного состава, который содержит антитело и один или более дополнительных активных агентов, а также введение композиций, содержащих антитела согласно настоящему изобретению и каждый активный агент в собственном отдельном фармацевтическом лекарственном составе. Например, антитело, такое как описано в настоящем документе, и другой активный агент можно вводить пациенту совместно в одной пероральной лекарственной композиции, такой как таблетка или капсула, или каждый агент вводят в виде отдельных пероральных лекарственных составов. Аналогично, антитело, такое как описано в настоящем документе, и другой активный агент можно вводить пациенту совместно в одной парентеральной лекарственной композиции, например, в физиологическом растворе или другом физиологически приемлемом растворе, или каждый агент вводят в виде отдельных парентеральных лекарственных составов. Если применяют отдельные лекарственные составы, то композиции, содержащие антитела и один или более дополнительных активных агентов, можно вводить по существу в одно время, т.е. одновременно, или с разнесением по времени, т.е. последовательно, и в любом порядке; следует понимать, что комбинированная терапия включает все указанные режимы.

Таким образом, в определенных вариантах реализации также рассматривается введение композиций антитела к TNFR2 согласно настоящему изобретению в комбинации с одним или более другими терапевтическими агентами. Указанные терапевтические агенты могут быть приняты в данной области техники в качестве стандартного способа лечения конкретного болезненного состояния, описанного в настоящем документе, такого как ревматоидный артрит, воспаление или рак. Примеры рассматриваемых терапевтических агентов включают цитокины, факторы роста, стероиды, НПВП, DMARD, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства или другие активные и вспомогательные агенты.

В определенных вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или более противораковыми иммунотерапевтическими агентами. В определенных случаях иммунотерапевтический агент модулирует иммунный ответ у субъекта, например, для повышения или поддержания связанного с раком или специфического в отношении рака иммунного ответа, и тем самым приводит к усиленному ингибированию или снижению числа раковых клеток иммунными клетками. Примеры иммунотерапевтических агентов включают полипептиды, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, лиганды и небольшие пептиды и их смеси. В качестве иммунотерапевтических агентов также включены небольшие молекулы, клетки (например, иммунные клетки, такие как Т-клетки), разные противораковые вакцины, генная терапия или другие агенты на основе полинуклеотидов, включая вирусные агенты, такие как онколитические вирусы, и другие агенты, известные в данной области техники. Таким образом, в определенных вариантах реализации противораковый иммунотерапевтический агент выбран из одного или более из агентов, модулирующих иммунные контрольные

точки, противораковых вакцин, онколитических вирусов, цитокинов и клеточной иммунотерапии.

В определенных вариантах реализации противораковый иммунотерапевтический агент представляет собой агент, модулирующий иммунные контрольные точки. Конкретные примеры включают «антагонисты» одной или более ингибиторных молекул иммунных контрольных точек и «агонисты» одной или более стимулирующих молекул иммунных контрольных точек. В общем случае, молекулы иммунных контрольных точек представляют собой компоненты иммунной системы, которые либо усиливают сигнал (костимуляторные молекулы), либо ослабляют сигнал, нацеленное воздействие на которые обладает терапевтическим потенциалом при раке, так как раковые клетки могут нарушать естественную функцию молекул иммунных контрольных точек (см., например, Sharma and Allison, *Science*. 348:56-61, 2015; Topalian et al., *Cancer Cell*. 27:450-461, 2015; Pardoll, *Nature Reviews Cancer*. 12:252-264, 2012). В некоторых вариантах реализации агент, модулирующий иммунные контрольные точки (например, антагонист, агонист), «связывает» или «специфически связывает» одну или более молекул иммунных контрольных точек, таких как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации агент, модулирующий иммунные контрольные точки, представляет собой антагонист или ингибитор одной или более ингибиторных молекул иммунных контрольных точек. Примеры ингибиторных молекул иммунных контрольных точек включают лиганд 1 белка запрограммированной клеточной смерти (PD-L1), лиганд 2 белка запрограммированной клеточной смерти (PD-L2), белок 1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1), содержащий V-домен Ig супрессор активации Т-клеток (VISTA), белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), триптофан-2,3-диоксигеназу (TDO), Т-клеточный белок 3 с доменом иммуноглобулина и доменом муцина (TIM-3), белок 3, кодируемый геном активации лимфоцитов (LAG-3), В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA), CD160, Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), и сигнальный регуляторный белок α (SIRP α).

В определенных вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор PD-1 (рецептора), нацеленное воздействие на который, как было показано, восстанавливает иммунную функцию в окружении опухоли (см., например, Phillips et al., *Int Immunol*. 27:39-46, 2015). PD-1 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и экспрессируется Т-клетками и про-В-клетками. PD-1 взаимодействует с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. PD-1 функционирует как ингибиторная молекула иммунных контрольных точек, например, снижая или предотвращая активацию Т-клеток, что, в свою очередь, снижает аутоиммунитет и способствует аутоотолерантности. Ингибирующий эффект PD-1 достигается по меньшей мере отчасти посредством двойного механизма промотирования апоптоза в антиген-специфических Т-клетках в лимфатических узлах при одновременном снижении апоптоза регуляторных Т-клеток (супрессорных Т-клеток). Некоторые примеры

антагонистов или ингибиторов PD-1 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент или небольшую молекулу, которые специфически связывают PD-1 и снижают одну или более форм его иммуносупрессорной активности, например, передачу сигнала последующими элементами каскада или взаимодействие с PD-L1. Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов PD-1 включают антитела ниволумаб, пембролизумаб, PDR001, MK-3475, AMP-224, AMP-514 и пидилизумаб и их антигенсвязывающие фрагменты (см., например, патенты США №8008449; 8993731; 9073994; 9084776; 9102727; 9102728; 9181342; 9217034; 9387247; 9492539; 9492540; и заявки на патент США №2012/0039906; 2015/0203579).

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор PD-L1. Как отмечалось выше, PD-L1 представляет собой один из естественных лигандов рецептора PD-1. Общие примеры антагонистов или ингибиторов PD-L1 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают PD-L1 и снижают одну или более форм его иммуносупрессорной активности, например, его связывание с рецептором PD-1. Конкретные примеры антагонистов PD-L1 включают антитела атезолизумаб (MPDL3280A), авелумаб (MSB0010718C) и дурвалумаб (MEDI4736) и их антигенсвязывающие фрагменты (см., например, патенты США №9102725; 9393301; 9402899; 9439962).

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор PD-L2. Как отмечалось выше, PD-L2 является одним из естественных лигандов рецептора PD-1. Общие примеры антагонистов или ингибиторов PD-L2 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают PD-L2 и снижают одну или более форм его иммуносупрессорной активности, например, его связывание с рецептором PD-1.

В определенных вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор VISTA. VISTA имеет размер примерно 50 кДа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (содержит один домен IgV) и к семейству B7. Он экспрессируется, главным образом, в лейкоцитах, и его транскрипция отчасти контролируется p53. Существуют доказательства того, что VISTA может выступать в качестве одновременно лиганда и рецептора в Т-клетках для ингибирования эффекторной функции Т-клеток и поддержания периферической толерантности. VISTA вырабатывается в больших количествах в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах, таких как миелоидные супрессорные клетки и регуляторные Т-клетки, и его блокирование антителом приводит к задержке роста опухоли в мышечных моделях меланомы и плоскоклеточной карциномы. Примеры антагонистических антител к VISTA включают, например, антитела, описанные в WO 2018/237287, содержание которой включено во всей полноте посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор CTLA-4. CTLA4 или CTLA-4 (белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), также называемый CD152 (кластер дифференцировки 152), представляет собой белковый рецептор, который функционирует как ингибиторная молекула иммунных

контрольных точек, например, передавая ингибиторные сигналы в Т-клетки, при связывании с CD80 или CD86 на поверхности антиген-представляющих клеток. Общие примеры антагонистов или ингибиторов CTLA-4 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают CTLA-4. Конкретные примеры включают антитела ипилимумаб и тремелимумаб и их антигенсвязывающие фрагменты. Как полагают, по меньшей мере отчасти активность ипилимумаба опосредована механизмом антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), который уничтожает супрессорные Treg, которые экспрессируют CTLA-4.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор IDO или антагонист или ингибитор TDO. IDO и TDO представляют собой ферменты катаболизма триптофана со свойствами подавления иммунной системы. Например, как известно, IDO подавляет Т-клетки и ЕК-клетки, вырабатывает и активирует Treg и миелоидные супрессорные клетки и способствует ангиогенезу опухоли. Общие примеры антагонистов или ингибиторов IDO и TDO включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают IDO или TDO (см., например, Platten et al., *Front Immunol.* 5: 673, 2014) и снижают или подавляют одну или более форм иммуносупрессорной активности. Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов IDO включают индоксимод (NLG-8189), 1-метилтриптофан (1MT), β -карболин (норгарман; 9H-пиридо[3,4-b]индол), розмариновую кислоту и эпакадостат (см., например, Sheridan, *Nature Biotechnology.* 33:321-322, 2015). Конкретные примеры антагонистов или ингибиторов TDO включают 680C91 и LM10 (см., например, Pilotte et al., *PNAS USA.* 109:2497-2502, 2012).

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор TIM-3. Т-клеточный белок 3 с доменом иммуноглобулина и доменом муцина (TIM-3) экспрессируется активированными CD4⁺ Т-клетками человека и регулирует цитокины Th1 и Th17. TIM-3 также действует как отрицательный регулятор функции Th1/Tc1, инициируя гибель клеток при взаимодействии с лигандом, галектином-9. TIM-3 связан с супрессорным микроокружением опухоли, и его повышенная экспрессия связана с неблагоприятным прогнозом при разных видах рака (см., например, Li et al., *Acta Oncol.* 54:1706-13, 2015). Общие примеры антагонистов или ингибиторов TIM-3 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают TIM-3 и снижают или подавляют одну или более форм его иммуносупрессорной активности.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор LAG-3. Белок 3, кодируемый геном активации лимфоцитов, (LAG-3) экспрессируется активированными Т-клетками, естественными клетками-киллерами, В-клетками и плазматоидными дендритными клетками. Он является отрицательным регулятором клеточной пролиферации, активации и гомеостаза Т-клеток аналогично CTLA-4 и PD-1 (см., например, Workman and Vignali. *European Journal of Immun.* 33: 970-9,

2003; и Workman et al., *Journal of Immun.* 172: 5450-5, 2004), и, как сообщалось, участвует в супрессорной функции Treg (см., например, Huang et al., *Immunity.* 21: 503-13, 2004). LAG3 также поддерживает CD8⁺ Т-клетки в толерогенном состоянии и совместно с PD-1 поддерживает истощение CD8 Т-клеток. Общие примеры антагонистов или ингибиторов LAG-3 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают LAG-3 и подавляют одну или более форм его иммуносупрессорной активности. Конкретные примеры включают антитело BMS-986016 и его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор BTLA. Экспрессия В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA; CD272) индуцируется во время активации Т-клеток и ингибирует Т-клетки посредством взаимодействия с рецепторами семейства факторов некроза опухоли (TNF-R) и семейства В7 рецепторов клеточной поверхности. BTLA представляет собой лиганд члена 14 суперсемейства факторов некроза опухоли (рецепторы) (TNFRSF14), также называемого медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM). Комплексы BTLA-HVEM отрицательно регулируют Т-клеточные иммунные ответы, например, подавляя функцию CD8⁺ онкоспецифических Т-клеток человека (см., например, Derré et al., *J Clin Invest* 120:157-67, 2009). Общие примеры антагонистов или ингибиторов BTLA включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают BTLA-4 и снижают одну или более форм его иммуносупрессорной активности.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор HVEM, например, антагонист или ингибитор, который специфически связывает HVEM и препятствует его взаимодействию с BTLA или CD160. Общие примеры антагонистов или ингибиторов HVEM включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают HVEM, необязательно ослабляют взаимодействие HVEM/BTLA и/или HVEM/CD160 и тем самым снижают одну или более форм иммуносупрессорной активности HVEM.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор CD160, например, антагонист или ингибитор, который специфически связывает CD160 и препятствует его взаимодействию с HVEM. Общие примеры антагонистов или ингибиторов CD160 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают CD160, необязательно ослабляют взаимодействие CD160/HVEM и тем самым снижают или подавляют одну или более форм иммуносупрессорной активности.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор TIGIT. Т-клеточный белок с доменом Ig и ITIM (TIGIT) представляет собой коингибиторный рецептор, который присутствует на поверхности ряда лимфоидных клеток и подавляет противоопухолевый иммунитет, например, посредством Treg (Kurtulus et al., *J Clin Invest.* 125:4053-4062, 2015). Общие примеры антагонистов или ингибиторов TIGIT

включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают TIGIT и снижают одну или более форм его иммуносупрессорной активности (см., например, Johnston et al., *Cancer Cell*. 26:923-37, 2014).

В определенных вариантах реализации агент представляет собой антагонист или ингибитор SIRP α . SIRP α представляет собой регуляторный мембранный гликопротеин, экспрессируемый, главным образом, миелоидными клетками, который взаимодействует с экспрессируемым в больших количествах трансмембранным белком CD47, обеспечивая отрицательное регулирование эффекторной функции клеток врожденной иммунной системы, такой как фагоцитоз клеток-хозяев. Определенные раковые клетки активируют ингибиторный путь передачи сигнала SIRP α -CD47, например, путем повышенной экспрессии CD47, и тем самым ингибируют фагоцитоз, опосредованный макрофагами. Было показано, что ингибиторы SIRP α снижают рост и метастазы рака отдельно и в сочетании с другими способами лечения рака (см., например, Yanagita, *JCI Insight*. 2017 Jan 12; 2(1): e89140). Общие примеры антагонистов или ингибиторов SIRP α включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, которые специфически связывают SIRP α и препятствуют передаче сигнала SIRP α -CD47 (см. выше).

В определенных вариантах реализации агент, модулирующий иммунные контрольные точки, представляет собой агонист одной или более стимуляторных молекул иммунных контрольных точек. Примеры стимуляторных молекул иммунных контрольных точек включают CD40, OX40, кодируемый геном белок, индуцируемый глюкокортикоидами, родственник семейству TNFR (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, CD28, CD226 и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM).

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист CD40. CD40 экспрессируется антиген-представляющими клетками (АПК) и в некоторых злокачественных образованиях. Его лигандом является CD40L (CD154). В АПК лигирование приводит к повышающей регуляции костимуляторных молекул, что потенциально позволяет обходить потребность в помощи Т-клеток при противоопухолевом иммунном ответе. Терапия агонистами CD40 играет важную роль в созревании АПК и их миграции из опухоли в лимфатические узлы, что приводит к повышенному представлению антигена и активации Т-клеток. Агонистические антитела к CD40 вырабатывают значительные ответы и стойкий противораковый иммунитет в животных моделях, и их действие опосредовано по меньшей мере отчасти цитотоксическими Т-клетками (см., например, Johnson et al. *Clin Cancer Res*. 21: 1321-1328, 2015; и Vonderheide and Glennie, *Clin Cancer Res*. 19:1035-43, 2013). Общие примеры агонистов CD40 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают CD40 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают CP-870,893, дацетузумаб, Chi Lob 7/4, ADC-1013, CD40L, rhCD40L и их антигенсвязывающие фрагменты. Конкретные примеры агонистов CD40 включают, но не ограничиваются

указанными, APX005 (см., например, заявку на патент США №2012/0301488) и APX005M (см., например, заявку на патент США №2014/0120103).

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист OX40. OX40 (CD134) способствует размножению эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти и подавляет дифференцировку и активность Т-регуляторных клеток (см., например, Croft et al., *Immunol Rev.* 229:173-91, 2009). Его лигандом является OX40L (CD252). Так как передача сигнала OX40 влияет как на активацию, так и на выживаемость Т-клеток, она играет ключевую роль в иницировании противоопухолевого иммунного ответа в лимфатическом узле и в поддержании противоопухолевого иммунного ответа в микроокружении опухоли. Общие примеры агонистов OX40 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают OX40 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают OX86, OX-40L, Fc-OX40L, GSK3174998, MEDI0562 (гуманизированный агонист OX40), MEDI6469 (агонист OX40 мышиных) и MEDI6383 (агонист OX40) и их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист GITR. Кодированный геном белок, индуцируемый глюкокортикоидами, родственник семейству TNFR, (GITR), усиливает размножение Т-клеток, подавляет супрессорную активность Treg и продлевает выживаемость эффекторных Т-клеток. Было показано, что агонисты GITR способствуют противоопухолевому ответу благодаря утрате стабильности линии Treg (см., например, Schaer et al., *Cancer Immunol Res.* 1:320-31, 2013). Указанные разнообразные механизмы показывают, что GITR играет важную роль в иницировании иммунного ответа в лимфатических узлах и в поддержании иммунного ответа в опухолевой ткани. Его лигандом является GITRL. Общие примеры агонистов GITR включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают GITR и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают GITRL, INCAGN01876, DTA-1, MEDI1873 и их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист CD137. CD137 (4-1BB) является членом семейства рецепторов фактора некроза опухоли (ФНО), и перекрестное сочетание с CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Опосредованная CD137 передача сигнала также защищает Т-клетки, такие как CD8⁺ Т-клетки, от клеточной смерти, индуцированной активацией. Общие примеры агонистов CD137 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают CD137 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают лиганд CD137 (или 4-1BB) (см., например, Shao and Schwarz, *J Leukoc Biol.* 89:21-9, 2011) и антитело утомилумаб, включая его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист CD27.

Стимуляция CD27 усиливает антигенспецифическое размножение наивных Т-клеток и вносит вклад в формирование памяти Т-клеток и долгосрочное поддержание Т-клеточного иммунитета. Его лигандом является CD70. Нацеленное воздействие на CD27 человека агонистическим антителом стимулирует активацию Т-клеток и противоопухолевый иммунитет (см., например, Thomas et al., *Oncoimmunology*. 2014;3:e27255. doi:10.4161/onci.27255; и He et al., *J Immunol*. 191:4174-83, 2013). Общие примеры агонистов CD27 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают CD27 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают CD70 и антитела варлиумаб и CDX-1127 (1F5), включая их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист CD28. CD28 конститутивно экспрессируется CD4⁺ Т-клетками и некоторыми CD8⁺ Т-клетками. Его лиганды включают CD80 и CD86, и его стимуляция усиливает размножение Т-клеток. Общие примеры агонистов CD28 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают CD28 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности. Конкретные примеры включают CD80, CD86, антитело TAB08 и его антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист CD226. CD226 представляет собой стимулирующий рецептор, который имеет общие лиганды с TIGIT, но в отличие TIGIT, вовлечение CD226 усиливает активацию Т-клеток (см., например, Kurtulus et al., *J Clin Invest*. 125:4053-4062, 2015; Bottino et al., *J Exp Med*. 1984:557-567, 2003; и Tahara-Hanaoka et al., *Int Immunol*. 16:533-538, 2004). Общие примеры агонистов CD226 включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд (например, CD112, CD155), которые специфически связывают CD226 и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности.

В некоторых вариантах реализации агент представляет собой агонист HVEM. Медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), также называемый членом 14 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF14), представляет собой рецептор клеточной поверхности человека из суперсемейства рецепторов ФНО. HVEM присутствует в разнообразных клетках, включая Т-клетки, АПК и другие иммунные клетки. В отличие от других рецепторов, HVEM экспрессируется в большом количестве в покоящихся Т-клетках, и при их активации происходит его понижающая регуляция. Было показано, что передача сигнала HVEM играет ключевую роль на ранних фазах активации Т-клеток и во время роста популяций опухолеспецифических лимфоцитов в лимфатических узлах. Общие примеры агонистов HVEM включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или небольшую молекулу, или лиганд, которые специфически связывают HVEM и усиливают одну или более форм его иммуностимулирующей активности.

В определенных вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или более биспецифическими или полиспецифическими антителами. Например, определенные биспецифические или

полиспецифические антитела могут (i) связывать и ингибировать одну или более ингибиторных молекул иммунных контрольных точек, а также (ii) связывать и действовать как агонисты одной или более стимуляторных молекул иммунных контрольных точек. В определенных вариантах реализации биспецифическое или полиспецифическое антитело (i) связывает и ингибирует одно или более из PD-L1, PD-L2, PD-1, CTLA-4, IDO, TDO, TIM-3, LAG-3, BTLA, CD160 и/или TIGIT, а также (ii) связывает и действует как агонист одного или более из CD40, OX40, кодируемого геном белка, индуцируемого глюкокортикоидами, родственного семейству TNFR (GITR), CD137 (4-1BB), CD27, CD28, CD226 и/или медиатора проникновения вируса герпеса (HVEM).

В некоторых вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с одной или более противораковыми вакцинами. В определенных вариантах реализации противораковая вакцина выбрана из одного или более из Онкофага, вакцины от папилломавируса человека HPV, необязательно Гардасила или Церварикса, вакцины против гепатита В, необязательно Энджерикса-В, Рекомбивакса HB или Твинрикса, и сипулейцела-Т (Провендж), или содержит раковый антиген, выбранный из одного или более из Her2/neu человека, рецептора Her1/EGF (EGFR), Her3, антигена A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (рецептор IgE), MAGE-3, антигена C242, 5T4, IL-6, IL-13, фактора роста эндотелия сосудов VEGF (например, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, тенасцина, виментина, рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), альфа-фетопротеина, инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1), угольной ангидразы 9 (CA-IX), карциноэмбрионного антигена (CEA), гуанилилциклазы C, NY-ESO-1, p53, сурвивина, интегрин $\alpha\beta3$, интегрин $\alpha5\beta1$, фолатного рецептора 1, трансмембранного гликопротеина NMB, белка активации фибробластов альфа (FAP), гликопротеина 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (или CA-125), фосфатидилсерина, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), антигена NR-LU-13, TRAIL-R1, члена 10b суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF10B или TRAIL-R2), члена 7 семейства SLAM (SLAMF7), антигена панкарциномы EGP40, фактора, активирующего В-клетки (BAFF), рецептора фактора роста тромбоцитов, гликопротеина ЕpCAM (17-1A), белка запрограммированной клеточной смерти 1, протеин-дисульфидизомеразы (PDI), фосфатазы регенерирующего белка печени 3 (PRL-3), кислой простатической фосфатазы, антигена Льюис-У, GD2 (дисиалированный ганглиозид, экспрессируемый в опухолях нейроэктодермального происхождения), глипикана-3 (GPC3) и мезотелина.

В некоторых вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или более онколитическими вирусами. В некоторых вариантах реализации онколитический вирус выбран из одного или более из талимогена лагерпарепвека (T-VEC), коксаквируса A21 (CAVATAK™), Онкорина (H101), пелареорепа (РЕОЛИЗИН®), вируса долины Сенека (NTX-010), *Senecavirus* SVV-001, ColoAd1, SEPREHVIR (HSV-1716), CGTG-102 (Ad5/3-D24-GMCSF), GL-ONC1, MV-NIS и

DNX-2401.

В определенных вариантах реализации противораковый иммунотерапевтический агент представляет собой цитокин. Примеры цитокинов включают интерферон (IFN)- α , IL-2, IL-12, IL-7, IL-21 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ).

В определенных вариантах реализации противораковый иммунотерапевтический агент представляет собой клеточную иммунотерапию, например, адоптивную Т-клеточную иммунотерапию. В некоторых вариантах реализации клеточная иммунотерапия включает Т-клетки, специфические в отношении раковых антигенов, необязательно Т-клетки, измененные *ex vivo*. В некоторых вариантах реализации Т-клетки, специфические в отношении раковых антигенов, выбраны из одной или более Т-клеток, модифицированных химерным рецептором антигена (CAR), и Т-клеток, модифицированных Т-клеточным рецептором (TCR), опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) и Т-клеток, индуцированных пептидами. В конкретных вариантах реализации Т-клетка, модифицированная CAR, нацелена на CD-19 (см., например, Maude et al., Blood. 125:4017-4023, 2015).

В некоторых вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, применяют в составе средств адоптивной иммунотерапии, например, средств аутологичной иммунотерапии. Определенные варианты реализации, таким образом, включают способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающие:

(a) инкубацию иммунных клеток, измененных *ex vivo*, с антителом к TNFR2 или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе; и

(b) введение аутологичных иммунных клеток пациенту.

В некоторых случаях иммунные клетки, измененные *ex vivo*, представляют собой аутологичные клетки, которые получают у пациента, которого лечат. В некоторых вариантах реализации аутологичные иммунные клетки содержат лимфоциты, естественные клетки-киллеры (ЕК), макрофаги и/или дендритные клетки (ДК). В некоторых вариантах реализации лимфоциты содержат Т-клетки, необязательно цитотоксические Т-лимфоциты (CTL). См., например, June, J Clin Invest. 117: 1466-1476, 2007; Rosenberg and Restifo, Science. 348:62-68, 2015; Cooley et al., Biol. of Blood and Marrow Transplant. 13:33-42, 2007; и Li and Sun, Chin J Cancer Res. 30:173-196, 2018, для описания адоптивной Т-клеточной и ЕК-клеточной иммунотерапии. В некоторых вариантах реализации Т-клетки содержат Т-клетки, специфические в отношении раковых антигенов, которые нацелены по меньшей мере на один «раковый антиген», такой как описано в настоящем документе. В определенных вариантах реализации антитело к TNFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент повышает эффективность иммунных клеток после адоптивного переноса.

В определенных вариантах реализации антитела к TNFR2, описанные в настоящем документе, можно вводить в сочетании с любым количеством химиотерапевтических агентов. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАНTM); алкилсульфонаты, такие как бусульфан,

импросульфамид и пипосульфамид; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламиламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфотриамид и триметилмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холотрифосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамид оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трифосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевина, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, пифтиномицин, пуриномицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозотоцин, туберцидин, убенимекс, циностафин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; средства, подавляющие функцию надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоптерин; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдотрексат; дефосфамин; демеколцин; диазаксон; элформитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамид; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитрактин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофитин; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазаксон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактон; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепан; таксоиды, например, паклитаксел (TAKCOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доцетаксел (TAKCOTER®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргетин™ (бексаротен), Панретин™ (алитретиноин); ОНТАК™ (денилейкин дифтитокс); эспермицины; капцитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше агентов. В данное определение также включены антигормональные агенты, которые действуют, регулируя или подавляя действие гормонов на опухоли, такие

как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гoserелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше агентов.

Ряд других терапевтических агентов можно применять в сочетании с антителами к TNFR2, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации антитело вводят совместно с противовоспалительным средством. Противовоспалительные агенты или лекарственные средства включают, но не ограничиваются указанными, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства, нацеленные на ФНО, циклофосфамид и микофенолат.

Примеры НПВП выбраны из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов Cox-2, таких как ВИОКС® (рофекоксиб) и ЦЕЛЕБРЕКС® (целекоксиб) и салилатов. Примеры обезболивающих средств выбраны из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола или пропаксифена гидрохлорида. Примеры глюкокортикоидов выбраны из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Примеры модификаторов биологического ответа включают молекулы, нацеленные на маркеры клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты ФНО (например, этанерцепт (ЭНБРЕЛ®), адалимумаб (ХУМИРА®) и инфликсимаб (РЕМИКЕЙД®), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (пероральное (ауранофин) и внутримышечное) и миноциклин.

В определенных вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, вводят в сочетании с цитокином. Под «цитокином» в настоящем документе понимают общий термин для обозначения белков, выделяемых одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами указанных цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов включены гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилзамещенный гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ), и лютеинизирующий гормон (ЛГ); ростовой фактор печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; факторы некроза опухоли-альфа и -бета; антимюллеров гормон; гонадотропин-ассоциированный пептид мышцы;

ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТРО); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобные факторы роста- I и -II; эритропоэтин (ЕРО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ); и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1-альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как ФНО-альфа или ФНО-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд Kit (KL). В настоящем документе термин «цитокин» включает белки из натуральных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные эквиваленты нативных последовательностей цитокинов.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие описанные в настоящем документе антитела, специфические в отношении TNFR2, вводят индивидууму, пораженному заболеванием, таким как описано в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь указанными, рак, воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания. Раковые заболевания включают, но не ограничиваются указанными, неходжкинские лимфомы, лимфому Ходжкина, кожную Т-клеточную лимфому, хронические лимфоцитарные лейкозы, острые миелоидные лейкозы, волосатоклеточные лейкозы, острые лимфобластные лейкозы, множественную миелому, карциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки и злокачественную меланому, помимо прочего. Таким образом, определенные варианты реализации включают способы лечения пациента, страдающего от рака, включающие введение пациенту композиции, описанной в настоящем документе, для лечения тем самым рака. В некоторых вариантах реализации рак связан с нарушенной экспрессией TNFR2 и/или подавлением иммунной системы, опосредованным TNFR2. В определенных вариантах реализации антитело для применения для лечения рака представляет собой антагонист TNFR2.

В некоторых вариантах реализации воспалительное или аутоиммунное заболевание связано с нарушенной экспрессией TNFR2. В некоторых вариантах реализации воспалительное или аутоиммунное заболевание связано с активацией иммунной системы, опосредованной агонистами TNFR2. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничиваются указанными, артрит (включая ревматоидный артрит, реактивный артрит), системную красную волчанку (СКВ), псориаз и воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), энцефаломиелит, увеит, тяжелую миастению, рассеянный склероз, инсулинозависимый диабет, болезнь Аддисона, целиакию, синдром хронической усталости, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную алопецию, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, болезнь Крона, фибромиалгию, вульгарную пузырчатку, Синдром Шегрена, болезнь Кавасаки, гипертиреоз/болезнь Грейвса, гипотиреоз/болезнь Хашимото,

эндометриоз, склеродермию, пернициозную анемию, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, болезнь Вегенера, гломерулонефрит, апластическую анемию (включая пациентов с апластической анемией после нескольких процедур переливания крови), пароксизмальную ночную гемоглобинурию, миелодиспластический синдром, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунную гемолитическую анемию, синдром Эвана, синдром ингибитора фактора VIII, системный васкулит, дерматомиозит, полимиозит и ревматическую лихорадку, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), аутоиммунный буллезный пемфигоид, болезнь Паркинсона, саркоидоз, витилиго, первичный билиарный цирроз и аутоиммунный миокардит.

Примеры воспалительных заболеваний включают, но не ограничиваются указанными, болезнь Крона, колит, дерматит, псориаз, дивертикулит, гепатит, синдром раздраженного кишечника (СРК), красную волчанку, нефрит, болезнь Паркинсона, язвенный колит, рассеянный склероз (РС), болезнь Альцгеймера, артрит, ревматоидный артрит, астму и разные сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз и васкулит. В определенных вариантах реализации воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, диабета, подагры, криопирин-ассоциированного периодического синдрома и хронической обструктивной болезни легких. В определенных вариантах реализации антитело для применения для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания представляет собой агонист TNFR2.

Например, в определенных вариантах реализации предложен способ лечения или снижения тяжести воспалительного заболевания путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанной в настоящем документе композиции, содержащей агонистические антитела к TNFR2. В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения, снижения тяжести или предотвращения болезни «трансплантат-против-хозяина» путем введения пациенту с трансплантатом, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанной в настоящем документе композиции, содержащей агонистические антитела к TNFR2. В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения, снижения тяжести или предотвращения отторжения трансплантата путем введения пациенту с трансплантатом, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанной в настоящем документе композиции, содержащей агонистические антитела к TNFR2.

В определенных вариантах реализации предложен способ лечения, снижения тяжести или предотвращения инфекционного заболевания путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества описанной в настоящем документе композиции, содержащей агонистические антитела к TNFR2. Инфекционные заболевания включают, но не ограничиваются указанными, вирусные, бактериальные, грибковые, необязательно дрожжевые и протозойные инфекции.

Для применения *in vivo* для лечения заболевания человека антитела, описанные в настоящем документе, в общем случае, включают в фармацевтическую композицию перед

введением. Фармацевтическая композиция содержит одно или более антител, описанных в настоящем документе, в комбинации с физиологически приемлемым носителем или вспомогательным веществом, таким как описано в других разделах настоящего документа. Для получения фармацевтической композиции эффективное количество одного или более соединений смешивают с любым(-и) фармацевтическим(-и) носителем(-ями) или вспомогательным веществом, которое(-ые) заведомо для специалистов в данной области техники подходит для конкретного режима введения. Фармацевтический носитель может представлять собой жидкость, полужидкое или твердое вещество. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного, подкожного или местного введения, могут включать, например, стерильный разбавитель (такой как вода), солевой раствор, нелетучее масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль или другой синтетический растворитель; противомикробные агенты (такие как бензиловый спирт и метилпарабены); антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота и бисульфит натрия) и хелатообразующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); буферы (такие как ацетаты, цитраты и фосфаты). При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатный буферный раствор (ФБР) и растворы, содержащие загустители и повышающие растворимость агенты, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их смеси.

Композиции, содержащие антитела, специфические в отношении TNFR2, описанные в настоящем документе, можно получать с применением носителей, которые защищают антитело от быстрого выведения из организма, таких как составы или покрытия с замедленным высвобождением. Указанные носители включают составы с контролируемым высвобождением, включая, но не ограничиваясь указанными, имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки, и биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, сложные полиортоэфиры, полимолочная кислота и другие агенты, известные специалистам обычной квалификации в данной области техники.

В настоящем документе предложены способы лечения с применением антител, которые связывают TNFR2. В одном из вариантов реализации антитело согласно настоящему изобретению вводят пациенту, страдающему от заболевания, при котором происходит ненадлежащая экспрессия TNFR2, что в контексте настоящего изобретения включает заболевания и нарушения, характеризующиеся нарушенной экспрессией или активностью TNFR2, вызванной, например, изменениями (например, статистически значимым увеличением или уменьшением) количества присутствующего белка или наличием мутантного белка или обоими указанными факторами. Появление избыточного количества может быть вызвано любой причиной, включая, но не ограничиваясь указанными, повышенную экспрессию на молекулярном уровне, присутствие в течение продолжительного периода времени или накопление в участке действия, или повышение (например, на статистически значимом уровне) активности TNFR2 по сравнению с активностью, обнаруживаемой в обычных условиях. Указанное избыточное количество

TNFR2 может быть измерено по сравнению с нормальным показателем экспрессии, уровнем или активностью сигнальных событий TNFR2, и результат указанного измерения может играть важную роль при разработке и/или клиническом исследовании антител, описанных в настоящем документе.

В частности, предложенные антитела подходят для лечения разнообразных форм рака, включая раковые заболевания, связанные с экспрессией или повышенной экспрессией TNFR2. Например, в определенных вариантах реализации предложен способ лечения рака, включая, но не ограничиваясь указанными, неходжкинские лимфомы, лимфому Ходжкина, кожные Т-клеточные лимфомы, хронические лимфоцитарные лейкозы, волосатоклеточные лейкозы, острые лимфобластные лейкозы, множественную миелому, карциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки и злокачественную меланому, путем введения пациенту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела, специфического в отношении TNFR2. Количество, которое после введения ингибирует, предотвращает или задерживает прогрессирование и/или метастазы рака на статистически значимом уровне (т.е. относительно соответствующего контроля, как известно специалистам в данной области техники), рассматривают как эффективное.

В некоторых вариантах реализации предложен способ снижения или предотвращения метастазов рака, включая, но не ограничиваясь указанными, неходжкинские лимфомы, лимфому Ходжкина, кожные Т-клеточные лимфомы, хронические лимфоцитарные лейкозы, волосатоклеточные лейкозы, острые лимфобластные лейкозы, множественную миелому, карциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки и злокачественную меланому, путем введения пациенту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела, специфического в отношении TNFR2 (например, количества, которое после введения подавляет, предотвращает или задерживает метастазы рака на статистически значимом уровне, т.е. относительно соответствующего контроля, как известно специалистам в данной области техники).

В некоторых вариантах реализации предложен способ предотвращения рака, включая, но не ограничиваясь указанными, неходжкинские лимфомы, лимфому Ходжкина, кожные Т-клеточные лимфомы, хронические лимфоцитарные лейкозы, волосатоклеточные лейкозы, острые лимфобластные лейкозы, множественную миелому, карциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки и злокачественную меланому, путем введения пациенту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела, специфического в отношении TNFR2.

В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения, подавления

прогрессирования или предотвращения неходжкинских лимфом, лимфомы Ходжкина, кожных Т-клеточных лимфом, хронических лимфоцитарных лейкозов, волосатоклеточных лейкозов, острых лимфобластных лейкозов, множественной миеломы, карцином поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки или злокачественной меланомы путем введения пациенту, пораженному одним или более из указанных заболеваний, терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела, специфического в отношении TNFR2.

В некоторых вариантах реализации антитела к TNFR2 применяют для определения структуры связанного антигена, например, конформационных эпитопов, причем указанную структуру можно затем применять для разработки соединений, имеющих или имитирующих данную структуру, например, способами химического моделирования и SAR.

Некоторые варианты реализации относятся отчасти к диагностическим применениям для обнаружения наличия клеток или тканей, экспрессирующих TNFR2. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы обнаружения TNFR2 в образце, такие как обнаружение клеток или тканей, экспрессирующих TNFR2. Указанные способы можно применять в ряде известных форматов обнаружения, включая, но не ограничиваясь указанными, иммуногистохимию (ИГХ), иммуноцитохимию (ИЦХ), гибридизацию *in situ* (ISH), цельную гибридизацию *in situ* (WISH), гибридизацию флуоресцентной ДНК *in situ* (FISH), проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (ИФА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

ISH представляет собой тип гибридизации, в котором используют меченную комплементарную цепь ДНК или РНК (т.е. первичный связывающий агент) для локализации специфической последовательности ДНК или РНК в области или срезе клетки или ткани (*in situ*), или если ткань достаточно мала, то во всей ткани (цельная ISH). Специалисту обычной квалификации в данной области техники будет очевидно, что данный способ отличается от иммуногистохимии, в которой белки локализуют в срезах ткани с применением антитела в качестве первичного связывающего агента. ISH ДНК можно применять в геномной ДНК для определения структуры хромосом. ISH (FISH) флуоресцентной ДНК можно, например, применять в медицинской диагностике для оценки целостности хромосом. ISH РНК (гибридизационная гистохимия) применяют для измерения и локализации мРНК и других транскриптов в срезах или цельных образцах ткани.

В разных вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, конъюгированы с детектируемой меткой, которая может быть обнаружена напрямую или опосредованно. В этом отношении «конъюгат» антитела относится к антителу к TNFR2, которое ковалентно связано с детектируемой меткой. В настоящем изобретении ДНК-зонды, РНК-зонды, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и производные антител, такие как одноцепочечное антитело с вариабельным фрагментом или

антитело, меченное эпитопом, могут быть ковалентно связаны с детектируемой меткой. При «прямом детектировании» применяют только одно детектируемое антитело, т.е. первичное детектируемое антитело. Таким образом, прямое детектирование означает, что антитело, которое конъюгировано с детектируемой меткой, может быть обнаружено как таковое в отсутствие необходимости добавления второго антитела (вторичного антитела).

«Детектируемая метка» представляет собой молекулу или материал, которые могут вырабатывать поддающийся обнаружению (например, визуальному, при помощи электронных устройств или иным образом) сигнал, который указывает на наличие и/или концентрацию метки в образце. При конъюгации с антителом детектируемую метку можно применять для определения местоположения и/или количественного определения мишени, на которую нацелено специфическое антитело. Таким образом можно определять наличие и/или концентрацию мишени в образце путем обнаружения сигнала, вырабатываемого детектируемой меткой. Детектируемую метку можно обнаруживать напрямую или опосредованно, и несколько разных детектируемых меток, конъюгированных с разными специфическими антителами, можно применять в комбинации для обнаружения одной или более мишеней.

Примеры детектируемых меток, которые могут быть обнаружены напрямую, включают флуоресцентные красители и радиоактивные вещества, и металлические частицы. В противоположность этому, для опосредованного обнаружения требуется применение одного или более дополнительных антител, т.е. вторичных антител, после применения первичного антитела. Таким образом, обнаружение проводят путем детектирования связывания вторичного антитела или связывающего агента с первичным детектируемым антителом. Примеры первичных детектируемых связывающих агентов или антител, которые требуют добавления вторичного связывающего агента или антитела, включают детектируемые ферментами связывающие агенты и детектируемые гаптенами связывающие агенты или антитела.

В некоторых вариантах реализации детектируемая метка конъюгирована с полимером нуклеиновой кислоты, который содержит первый связывающий агент (например, в способе ISH, WISH или FISH). В определенных вариантах реализации детектируемая метка конъюгирована с антителом, которое содержит первый связывающий агент (например, в способе ИГХ).

Примеры детектируемых меток, которые могут быть конъюгированы с антителами, применяемыми в способах согласно настоящему изобретению, включают флуоресцентные метки, ферментные метки, радиоизотопы, хемилюминесцентные метки, электрохемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки, полимеры, полимерные частицы, металлические частицы, гаптены и красители.

Примеры флуоресцентных меток включают 5-(и 6)-карбоксифлуоресцеин, 5- или 6-карбоксифлуоресцеин, 6-(флуоресцеин)-5-(и 6)-карбоксамидогексановую кислоту, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, тетраметилродамин и красители, такие как $Cy2$, $Cy3$, и $Cy5$, необязательно замещенный кумарин, включая AMCA, PerCP, фикобилипротеины,

включая R-фикоэритрин (RPE) и аллофикоэритрин (APC), тexasский красный, принстонский красный, зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ) и его аналоги, и конъюгаты R-фикоэритрина или аллофикоэритрина, неорганические флуоресцентные метки, такие как частицы на основе полупроводникового материала, такого как нанокристаллиты CdSe с покрытием.

Примеры меток на основе полимерных частиц включают микрочастицы или латексные частицы полистирола, ПММА или диоксида кремния, которые могут быть заключены во флуоресцентные красители, или полимерные мицеллы или капсулы, которые содержат красители, ферменты или субстраты.

Примеры меток на основе металлических частиц включают частицы золота и частицы золота с покрытием, которые могут быть преобразованы путем окрашивания серебром. Примеры гаптенных меток включают DNP, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), биотин и дигоксигенин. Примеры ферментных меток включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу (ALP или AP), β -галактозидазу (GAL), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, β -N-ацетилглюкозаминидазу, β -глюкуронидазу, инвертазу, ксантиноксидазу, люциферазу светлячков и глюкозооксидазу. Примеры широко используемых субстратов для пероксидазы хрена включают 3,3'-диаминобензидин (DAB), диаминобензидин с никелем для усиления окрашивания, 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), бензидина дигидрохлорид (BDHC), реагент Хэнкера-Йейтса (HYP), индофан синий (IB), тетраметилбензидин (TMB), 4-хлор-1-нафтол (CN), альфа-нафтолпиронин (альфа.-NP), о-дианизидин (OD), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), нитро-синий тетразолий (NBT), 2-(п-йодфенил)-3-п-нитрофенил-5-фенилтетразолия хлорид (INT), тетра-нитро-синий тетразолий (TNBT), 5-бром-4-хлор-3-индоксил-бета-D-галактозид/ферро-феррицианид (BCIG/FF).

Примеры широко используемых субстратов для щелочной фосфатазы включают нафтол-AS-B 1-фосфат/светопроочный красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/светопроочный красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/светопроочный красный TR (NABP/FR), нафтол-AS-MX-фосфат/светопроочный красный TR (NAMP/FR), нафтол-AS-B1-фосфат/новый фукцин (NABP/NF), бромхлориндолилфосфат/нитро-синий тетразолий (BCIP/NBT), 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (BCIG).

Примеры люминесцентных меток включают люминол, изолюминол, сложные эфиры акридиния, 1,2-диоксетаны и пиридопиридазины. Примеры электрохемилюминесцентных меток включают производные рутения. Примеры радиоактивных меток включают радиоактивные изотопы йода, кобальта, селена, трития, углерода, серы и фосфора.

Детектируемые метки могут быть связаны с антителами, описанными в настоящем документе, или с любой другой молекулой, которая специфически связывает биологический маркер, представляющий интерес, например, антитело, зонд нуклеиновой кислоты или полимер. Кроме того, специалисту обычной квалификации в данной области техники будет очевидно, что детектируемые метки также могут быть конъюгированы со

вторым и/или третьим, и/или четвертым и/или пятым связывающими агентами или антителами и т.д. Более того, специалисту в данной области будет очевидно, что каждый(-ое) дополнительный(-ое) связывающий агент или антитело, применяемый(-ое) для описания характеристик биологического маркера, представляющего интерес, можно применять на стадии амплификации сигнала. Биологический маркер может быть обнаружен визуально, например, при помощи световой микроскопии, флуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии, где обнаруживаемое вещество представляет собой, например, краситель, частицу коллоидного золота, люминесцентный реагент. Визуально детектируемые вещества, связанные с биологическим маркером, также могут быть обнаружены при помощи спектрофотометра. Если детектируемое вещество представляет собой радиоактивный изотоп, то оно может быть обнаружено визуально путем ауторадиографии или не визуальными средствами при помощи сцинтилляционного счетчика. См., например, Larsson, 1988, *Immunocytochemistry: Theory and Practice*, (CRC Press, Boca Raton, Fla.); *Methods in Molecular Biology*, том 80 1998, John D. Pount (ред.) (Humana Press, Totowa, N.J.).

В изобретении дополнительно предложены наборы для обнаружения TNFR2 или клеток или тканей, экспрессирующих TNFR2, в образце, причем наборы содержат по меньшей мере одно антитело, полипептид, полинуклеотид, вектор или клетку-хозяина, такие как описано в настоящем документе. В определенных вариантах реализации набор может содержать буферы, ферменты, метки, субстраты, гранулы или другие поверхности, к которым присоединены антитела согласно изобретению и т.д., и инструкции по применению.

Примеры

Пример 1

Иммунизация и первичный скрининг

Для получения антител для скрининга иммунизировали четырех новозеландских белых кроликов и затем повторно иммунизировали бустерной дозой либо клетками человека 293 с повышенной экспрессией TNFR2, либо слитым белком TNFR2-Fc человека. У всех кроликов титры антител в сыворотке были специфическими в отношении TNFR2 человека, и их применяли для получения гибридомы с использованием технологии APXiMAV™ и антител при помощи способа культивирования В-клеток (RevMAb). При первичном скрининге было выявлено 460 антител, которые связывались с клетками с повышенной экспрессией CHO-TNFR2. Способ скрининга для выявления потенциальных наилучших кандидатов показан на **фигуре 2**.

Затем использовали надосадочные жидкости культур гибридомы и В-клеток для скрининга антител, которые могут блокировать связывание ФНО- α с растворимым TNFR2-His (Sino Biological; 10417-H08H) в исследовании связывания рецептор-лиганд на основе ELISA. Среди 460 выявленных антител для 173 было продемонстрировано ингибирование связывания ФНО- α с TNFR2 более чем на 75% от максимального связывания.

Отбирали 110 антител для перехода на стадию исследования химерного IgG

человека. Среди 110 антител, прошедших стадию клонирования В-клеток, 28 клонов не могли быть амплифицированы. Тяжелые и легкие цепи 82 оставшихся клонов амплифицировали и напрямую клонировали в остов IgG1 человека. Экспрессировали 82 химерных антитела и проводили секвенирование в надосадочных жидкостях, которые давали положительный результат при связывании с клеточными TNFR2. Проводили химеризацию, секвенирование всех 10 антител, выявленных в исследовании гибридомы, которые прошли начальную скрининговую «воронку», и переходили к следующей стадии.

Для отбора 25 антител из культуры В-клеток для дальнейшего исследования использовали анализ последовательностей (уникальность и ограничивающие требования к потенциальной разработке, такие как гликозилирование, деаминирование и т.д. и длина CDR3). Все 10 клонов гибридомы использовали далее независимо от анализа последовательности. Два набора клонов из гибридомы имели идентичные последовательности, как указано в сводной таблице (**таблица E1**) при помощи звездочек или знака решетки (8G11,5=37D1,4 и 28B7,3=37H4.1). Для экспрессии рекомбинантных химерных антител котрансфицировали плазмиды тяжелой (H) и легкой (L) цепей в клетки 293 и собирали надосадочные жидкости через 7-10 дней. Очищали антитела на колонке с протеином А и проводили диализ в ФБР.

Определение характеристик химерных антител человека in vitro. Проводили скрининг химерных антител в отношении связывания с растворимым и экспрессируемым в клетках TNFR2 человека, растворимым TNFR2 яванского макака и мыши и блокирования ФНО-α на основе ELISA. В выборках данных на фигурах 3A-3D показана первая группа антител, а в выборках данных на фигурах 4A-4D показана вторая группа антител. Также проводили скрининг антител в ELISA со связыванием пептида в отношении предварительного связывания эпитопа с использованием пептидов из доменов PLAD или CRD1 (а.к. 17-54; TCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCD), CRD2 (а.к. 58-93; DSTYTQLWNWVPECLSCGSRSSDQVETQACTREQN), CRD3 (а.к. 106-133; LSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTE и а.к. 114-133; LCAPLRKCRPGFGVARPGTE) и CRD4 (пептид 5; а.к. 146-174; и TFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIPGNAS) (см. краткое описание данных ниже в **таблице E1**).

Клон	EC50 (нМ) hTNFR2 (растворимый)	EC50 (нМ) hTNFR2 (клетка)	Место в рейтинге связывания клеток hTNFR2	EC50 (нМ) TNFR2 яв.м.	IC50 (нМ) Блокирование ФНОα	Место в рейтинге блокирования ФНОα	Потенциальная группа пептида	перекрестная реактивность у мыши
4	0,094	0,147	10	0,099	2,743	4	НО	Нет
6	0,147	0,277	17	0,104	5,634	18	PLA	Нет

							D	
9	0,144	0,147	11	0,151	2,783	5	HO	Нет
23.71	0,206	0,260	16	0,243	5,41	16	3/4	Нет
24	0,098	0,100	6	0,093	3,156	9	2/3	Нет
25.71	0,147	0,091	4	0,197	2,98	7	3	Нет
37	0,126	0,100	7	0,148	3,253	10	HO	Нет
42	0,242	0,091	5	0,184	11,17	21	HO	Нет
57	0,067	0,073	1	0,057	0,7407	1	2/3	Нет
75	0,1927	0,1261	9	0,2154	4,247	13	3/4	Нет
81	7,387	9,443	24	4,036	Отсутствует	-	PLA D	Нет
82	0,238	0,172	13	0,192	3,542	11	3	Нет
92	0,131	0,086	2	0,191	3,056	8	3	Нет
102	0,2068	0,09014	3	0,3268	100	25	HO	Нет
107	0,325	0,485	19	0,315	2,221	2	HO	Нет
108	0,256	0,180	15	0,327	4,555	15	4	Нет
127	0,3134	0,1097	8	60,04	6,616	20	HO	Нет
7H2.5	0,067	HO	HO	0,1774	5,542	17	3	Нет
8G10.7	0,2431	HO	HO	0,2686	Отсутствует	-	HO	Нет
8G11.5*	0,157	HO	HO	0,09275	24,57	23	HO	Нет
9B11.2	0,193	HO	HO	0,1382	Слабое	-	HO	Нет
11D7.1	0,1398	0,17	12	0,03963	6,095	19	3	Нет
11G12.1	0,2612	HO	HO	0,1908	Слабое	-	HO	Нет
28B7.3#	0,1486	0,321	18	0,07626	2,97	7	3	Нет
37D1.4*	0,1559	HO	HO	0,08096	27,79	24	HO	Нет
37H4.1#	0,1839	HO	HO	0,1947	2,923	6	3	Нет
55F6.1	0,1238	1,32	22	0,08616	4,353	14	HO	Нет
24-2	0,0981	HO	HO	0,07422	Отсутствует	-	5	Нет
25-10	0,08616	0,513	20	0,02353	Сильное	-	5	Есть
24-25	0,2101	HO	HO	0,1893	Сильное	-	5	Есть
24-62	0,1374	HO	HO	0,09579	Сильное	-	5	Есть
24-97	0,06322	HO	HO	0,08597	Отсутствует	-	5	Есть
24-124	0,1372	0,179	14	0,08818	2,537	3	5	Нет

25-31	0,07043	3,145	23	0,03804	4,129	12	5	Нет
25-103	0,04426	0,946	21	0,0003477	Сильное	-	5	Есть

Отбирали пятнадцать из 35 антител для гуманизации на основании аффинности связывания, перекрестной реактивности с антителами яванского макака, блокирующей способности и способности захвата ряда эпитопных групп (выделены жирным шрифтом в **таблице E1**). Среди 15 гуманизированных клонов три клон не блокировали связывание ФНО- α в ELISA, но связывались с пептидом пять, и было сделано предположение о том, что они блокируют ФНО- α на клеточной поверхности, блокируя тримеризацию TNFR2. Удаляли из выборки клоны, которые имели идентичные последовательности и которые не связывали с высокой активностью TNFR2 яванского макака или человека или не блокировали связывание ФНО- α .

Гуманизировали антитела с применением запатентованной технологии с контролированием по мутационной линии (MLG) на каркасе IgG₁ человека. Связывание одного из 15 антител с антигеном в ELISA разрушалось, и продукт не мог быть выделен. Проводили скрининг оставшихся 14 антител в отношении связывания TNFR1 и TNFR2 человека, связывания клеточного TNFR2, связывания TNFR2 яв.м. и блокирования ФНО- α в ELISA и FACS (см. **фигуры 5-8**). Антитела, которые связывали пептид 5 и не блокировали ФНО- α на химерной стадии, не блокировали связывание ФНО- α в клеточном ELISA и, таким образом, их удаляли из выборки. Антитела, которые сохраняли сильное связывание с клеточным TNFR2, исследовали в отношении АЗКЦ для клеточных линий CHO с повышенной экспрессией TNFR2 с использованием репортерного набора Promega ADCC Jurkat NFAT (**фигуры 9А-9В**). Характеристики гуманизированных кандидатов показаны ниже в **таблице E2**. Пять наилучших кандидатов (выделенные жирным шрифтом) удовлетворяли желаемым критериям.

Таблица Е2

Клон	EC50 (нМ) hTNFR2 (растворимый)	EC50 (нМ) hTNFR2 (клеточный)	KD (нМ) hTNFR2 (клетки ОЕ)	EC50 (нМ) TNFR2 яв.м.	Блокировани е (растворимог о) ФНО-α IC50 (нМ)	Блокирование (клеточного) ФНО- α IC50 (нМ)	АЗКЦ	Перекрестная реактивность с TNFR1 человека
108	0,105	0,31	0,0994	0,046	1,333	0,198	+++	
25-71	0,159	0,242	0,12	0,123	1,964	0,149	+++	
11D7.1	0,091	0,239	0,2013	0,054	2,955	0,3225	++	+
28B7.3	0,24	0,28	0,1298	0,211	2,465	0,3788	+	
24-2	0,149	0,377	0,2449	0,131	3,517	0,447	+	
55F6.1	0,131	0,672	0,539	0,109	3,81	0,566		
24-124	0,098	0,408	0,2906	0,058	2,295	0,5669	++	
9	0,051	0,587	0,3868	0,046	0,465	7,02		
4	0,111	1,129		0,34	3,572	Отсутствует		
25-10	0,053	1,38	1,053	0,113	Отсутствует	Отсутствует	+	
25-31	0,72	12,08	12,08	1,858	Отсутствует	Отсутствует	+	+
25-103	0,097	0,57	0,468	0,107	Отсутствует	Отсутствует	+++	
24	0,142	1,986	1,496	0,091	Слабое	Отсутствует		
37	0,072	109,1	н/д	0,056	Отсутствует	НО		
92	-	-	-		НО	НО		

Выбор наилучшего кандидата и резервного варианта. Проводили исследование АЗКЦ на клеточной линии с повышенной экспрессией, а также исследования специфичности в отношении членов семейства TNFR, высвобождения цитокинов и анализ пригодности для разработки для облегчения отбора 2 наилучших кандидатов, которых использовали далее в CLD. В **таблице Е3** ниже показаны результаты анализа гуманизации в процентах.

Таблица Е3				
Гуманизированные наилучшие кандидаты	Структура каркаса НС зародышевой линии	% идентичности НС с каркасом IMGT	Структура каркаса LC зародышевой линии	% идентичности LC с каркасом IMGT
h600_23_28B7	VH3-66 5//87	94,3	VKO2 4/87	95,4
h600_25_108	VH3-66 4//87	95,4	VKO2 3/87	96,5
h600_25_71	VH3-66 5//87	94,3	VKL5 3/87	96,5
h600_24_2	VH3-66 4//87	95,4	VKO2 2/87	97,7
h600_24_124	VH3-66 6//87	93,1	VKO2 2/87	97,7

Пример 2

Характеристики связывания и активности клонов h600-25-71 и h600-25-108

Исследовали характеристики связывания и активности гуманизированных клонов h600-25-71 и h600-25-108. Для исследования связывания с членами семейства TNFR наносили покрытие белковых мишеней на планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Промывали планшеты, блокировали и добавляли антитела в указанных концентрациях в течение 1 часа при КТ. Использовали антитела положительного контроля для каждого белка в концентрации ~1 мкг/мл. Промывали антитела и детектировали с использованием античеловеческого HRP IgG в течение 1 часа. Проявляли исследуемую систему с применением субстрата TMB в течение 10 минут. Для связывания клеток культивировали CD4⁺ Т-клетки человека, очищенные от лейкоцитарной оболочки, в плоскодонных планшетах с антителами к CD3/CD28 в течение 24 часов. Собирали клетки и окрашивали для определения жизнеспособности CD4, CD25 и FOXP3. Детектировали окрашивание исследуемого антитела с применением АПК с античеловеческим IgG. Оценивали связывание исследуемых антител методом титрования с использованием CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток и строили график для связывания в процентах.

Результаты на **фигурах 10А-10F** показывают, что 25-71 и 25-108 с высокой аффинностью связывали TNFR2, включая белок TNFR2 человека (10C), белок TNFR2 яванского макака (10D), экспрессируемый в клетках TNFR2 человека (10E) и активированные T_{reg} человека (10F). Результаты на **фигурах 11А-11Е** показывают, что 25-71 и 25-108 являются специфическими в отношении TNFR2 и не связывают TNFR1, HVEM,

CD40, DR6 или OPG. Изотипный контроль IgG обозначен треугольниками, и положительные контроли обозначены звездочками.

Для исследования действия антител в отношении клеток, экспрессирующих TNFR2, посредством механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), проводили исследования АЗКЦ, как описано выше. Как показано на фигурах **12А-12В**, 25-71 и 25-108 индуцировали АЗКЦ в отношении клеток, экспрессирующих TNFR2, включая опухолевые клетки (12В).

Для исследования действия антител в отношении T_{reg} выделяли МКПК из камер для лейкоредукции. Стимулировали 2×10^5 МКПК при помощи 0,1 мкМ/мл антитела к CD3 (клон: ОКТ3) и обрабатывали антителами к TNFR2 в течение 16-24 часов в инкубаторе с влажной атмосферой, 5% CO₂, при 37°C в 96-луночном планшете с плоским дном лунок. Культивировали клетки в полной RPMI (10% инактивированной нагреванием ЭБС, 1X пенициллин-стрептомицин, 1 мМ пируват натрия, 1X MEM с заменимыми аминокислотами, 50 мМ β-меркаптоэтанол). Собирали клетки и идентифицировали CD4 Treg как CD4+ CD25hi FoxP3+ путем проточной цитометрии. Как показано на фигурах **13А-13В**, 25-71 и 25-108 истощали T_{reg} в МКПК человека. На обоих графиках показано среднее значение для 5 доноров, где каждое условие исследовали в двух повторностях. Истощение в % = $100 * (\text{без истощения}^* - \text{эксперимент}) / (\text{без истощения})$, где параметр «без истощения» относится к МКПК, стимулированным только антителом к CD3.

Для исследования действия антител в отношении опосредованного макрофагами антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) опухолевых клеток, экспрессирующих TNFR2 (см. **фигуру 14А**), получали макрофаги путем культивирования CD14+ моноцитов человека совместно с 10 мкг/мл М-КСФ в течение 6 дней в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Метили полученные макрофаги совместно с клетками CHO с повышенной экспрессией TNFR2 (мишень) при помощи CellTrace CFSE и Violet, соответственно. Инкубировали клеточные мишени совместно с антителом к TNFR2 или изотипным контролем во льду в течение 30 минут. Совместно культивировали меченные клетки при отношении 100000 макрофагов на 50000 клеточных мишеней в RPMI, содержащей сыворотку с низким содержанием IgG человека, в течение 3 часов. Анализировали клетки на проточном цитометре Cytoflex LX. Как показано на **фигуре 14В**, 25-71 и 25-108 индуцировали опосредованный макрофагами АЗКФ клеток TNFR2+. Вычисляли уровень фагоцитоза в процентах следующим образом: $((\% \text{ клеток с двойным положительным статусом}) / (\text{общий \% клеточных мишеней})) * 100$.

Для исследования действия антител в отношении подавления CD8 Т-клеток миелоидными супрессорными клетками (МСК) получали МСК путем совместного культивирования МКПК человека с опухолевой клеточной линией 786-О в течение 7 дней. Выделяли CD33+ МСК методом позитивного отбора с применением микрогранул (Miltenyi). Метили аутологичные CD8 Т-клетки при помощи CellTrace Violet и культивировали совместно с МСК в отношении 4:1 в течение 3 дней при стимуляции CD3/CD28. Через 3 дня метили клетки красителем для определения жизнеспособности и

измеряли пролиферацию CD8 Т-клеток методом разбавления фиолетовым красителем. См. схему эксперимента на **фигуре 15А**.

Как показано на **фигурах 15В-15С**, 25-71 и 25-108 значительно снижали подавление CD8 Т-клеток под действием МСК. Подавление в процентах вычисляли следующим образом: $[(\text{Т-клетки отдельно} - (\text{Т+МСК}))/\text{Т отдельно}] \times 100$. Данные представлены на графике как среднее $\pm$ СОС. Изотип IgG1 изображен на графике при помощи черных столбцов, 25-71 при помощи серых столбцов, а 25-108 при помощи незакрашенных столбцов. Статистические параметры получали при помощи ANOVA и $*=P<0,01$, и $**=P<0,001$.

Для дополнительного исследования действия антител в отношении регуляторных Т-клеток выделяли CD4 Т-клетки из МПКП, полученных из лейкоцитарных пленок здорового человека, методом отрицательного отбора с применением магнитных гранул (Miltenyi). Истощали CD25⁺ T_{reg} с использованием магнитных гранул CD25 согласно протоколу производителя (Miltenyi) и проводили криоконсервацию полученных CD4 клеток (Т-респондерные клетки) до начала исследования. Выделяли T_{reg} от аутологичных доноров согласно протоколу производителя и выращивали в течение 15 дней с использованием гранул для выращивания Treg (DynaBeads) и 100 нМ рапамицина. За день до начала исследования размораживали Т-респондерные клетки и выдерживали в течение ночи. На следующий день метили Т-респондерные клетки при помощи CellTrace Violet и добавляли к T_{reg} при указанных отношениях в круглодонные планшеты совместно с 10 мкг/мл 25-71 или изотипного контроля. Добавляли контрольные гранулы для T_{reg} (Miltenyi) и инкубировали исследуемые системы в течение 5 дней. Собирали клетки на 5 день, окрашивали красителем для определения жизнеспособности и анализировали на анализаторе MACSQuant. Вычисляли подавление Т-клеток в процентах как (пролиферация только стимулированных Т-респондеров - пролиферация исследуемого вещества)/(только стимулированный Т-респондер). Проводили эксперимент по меньшей мере для четырех доноров. Как показано на **фигурах 18А-18Е**, клон 25-71 обращал вспять подавление эффекторных Т-клеток под действием T_{reg}.

Значения аффинности связывания (KD) и EC₅₀ из приведенных выше экспериментов сведены ниже в **таблице Е4**.

Таблица Е4		
	Ab 25-71	Ab 25-108
Аффинность первичных клеток (KD)	47 пМ	50 пМ
АЗКЦ EC ₅₀ (репортерная линия)	1,14 нМ	1,135 нМ
АЗКФ EC ₅₀	0,71 нМ	0,92 нМ

Для исследования действия антител у мышей самкам бестимусных мышей вводили п.к. инъекцию опухолевых клеток Colo205. При объеме опухоли 100 мм³ лечили мышей,

как показано на **фигуре 19А**. Наблюдали значительное противоопухолевое действие (48% TGI) для антитела 25-71 по сравнению с контролем (см. **фигуру 19В**). Изменения массы тела в группах лечения по сравнению с контролем не наблюдали (см. **фигуру 19С**).

Пример 3

Идентификация эпитопных сайтов для клона 25-71

Проводили эксперименты для определения эпитопа в комплексе TNFR2/25-71 с высоким разрешением.

Во-первых, проводили анализ MALDI для высокомолекулярных частиц для образцов только TNFR2 и только клона 25-71 для подтверждения целостности и уровня агрегации. Проводили измерения на масс-спектрометре Autoflex II MALDI ToF (Bruker), оборудованном модулем для взаимодействия HM4 (CovalX), который содержит детектирующую систему, выполненную с возможностью оптимизации обнаружения частиц массой до 2 МДа при чувствительности в наномолярном диапазоне. Растворяли порошок образца TNFR2 в дистиллированной воде до достижения концентрации 1 мг/мл и при помощи пипетки разбавляли по 20 мкл каждого образца белка TNFR2 и клона 25-71 для получения 8 разбавленных растворов с конечным объемом 10 мкл. Затем смешивали 1 мкл каждого разбавленного раствора с 1 мкл матрицы, состоящей из матрицы перекристаллизованной синапиновой кислоты (10 мг/мл) в смеси ацетонитрил/вода (1:1, об./об.), 0,1% ТФУК (набор K200 MALDI). После перемешивания наносили 1 мкл каждого образца в виде пятна в планшет MALDI (SCOUT 384). После кристаллизации при комнатной температуре помещали планшет в масс-спектрометр MALDI и немедленно анализировали в режиме MALDI для высокомолекулярных частиц.

Эксперименты перекрестного сочетания. Эксперименты для перекрестного сочетания позволяют проводить прямой анализ нековалентного взаимодействия путем масс-спектрометрии MALDI для высокомолекулярных частиц. Благодаря смешению образца белка, вступающего в нековалентные взаимодействия со смесью для перекрестного сочетания (Bich et al., Anal. Chem. 82 (1), стр. 172-179, 2010), появляется возможность специфического обнаружения нековалентного комплекса с высокой чувствительностью. Обеспечиваемое в результате ковалентное связывание позволяет взаимодействующим частицам выдерживать способ получения образца и ионизацию MALDI. Система обнаружения высокомолекулярных частиц позволяет описывать взаимодействие частиц с массой в высокомолекулярном диапазоне.

Каждую смесь, полученную для контрольного эксперимента (оставляли 9 мкл), использовали для перекрестного сочетания с применением набора для анализа MC K200 MALDI (CovalX). Смешивали по девять мкл смесей (от 1 до 1/128) с 1 мкл реагента-стабилизатора K200 (2 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре. После инкубации (180 минут) готовили образцы для анализа MALDI, как описано для контрольных экспериментов. Анализировали образцы при помощи анализа MALDI для высокомолекулярных частиц сразу после кристаллизации с применением модуля для взаимодействия HM4 (CovalX) со стандартным азотным лазером и фокусированием на

разных массовых диапазонах от 0 до 1500 кДа.

Результаты. Масс-спектрометрия MALDI для высокомолекулярных частиц и химический анализ перекрестного сочетания не выявили каких-либо нековалентных агрегатов клон 25-71 или мультимеров TNFR2.

Затем комплексы TNFR2/25-71 были описаны при помощи масс-спектрометра MALDI ToF Autoflex II (Bruker), оборудованного модулем для взаимодействия HM4 (CovalX). Получали 10 мкл смеси TNFR2/25-71 с соответствующими концентрациями 1,25 мкМ/0,5 мкМ. Смешивали один мкл смеси с 1 мкл матрицы, состоящей из матрицы перекристаллизованной синапиновой кислоты (10 мг/мл) в смеси ацетонитрил/вода (1:1, об./об.), 0,1% ТФУК (набор K200 MALDI). После перемешивания наносили 1 мкл каждого образца в виде пятна в планшет MALDI (SCOUT 384). После кристаллизации при комнатной температуре помещали планшет в масс-спектрометр MALDI и немедленно анализировали.

Эксперименты перекрестного сочетания. Смесь, полученную для контрольного эксперимента (оставляли 9 мкл), использовали для перекрестного сочетания с применением набора для анализа MC K200 MALDI (CovalX). Смешивали девять мкл смеси с 1 мкл реагента-стабилизатора K200 (2 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре. После инкубации (180 минут) готовили образцы для анализа MALDI, как описано для контрольных экспериментов. Анализировали образцы при помощи анализа MALDI для высокомолекулярных частиц сразу после кристаллизации.

Проводили анализ MC MALDI ToF с использованием модуля для взаимодействия HM4 (CovalX) со стандартным азотным лазером и фокусированием на разные массовые диапазоны от 0 до 1500 кДа.

Результаты. В контрольном эксперименте детектировали TNFR2 и клон 25-71 с $MH^+=37,179$ кДа и $MH^+=147,708$ кДа. После перекрестного сочетания обнаруживали два дополнительных пика с $MH^+=189,401$ кДа и $MH^+=228,341$ кДа. Проводили наложение спектров для контрольного образца и образца после перекрестного сочетания при помощи программного обеспечения Complex Tracker, которое обнаруживало два нековалентных белковых комплекса с $MH^+=186,113$ кДа и $MH^+=224,384$ кДа.

Для определения эпитопа сначала обрабатывали TNFR2 путем протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином, затем проводили анализ MC/MC nLC-LTQ-Orbitrap. Совместное картирование пептидов подтверждало совпадение с примерно 94,57% последовательности TNFR2 (данные не показаны).

Для определения эпитопа комплексов TNFR2/25-71 с высоким разрешением инкубировали комплексы с дейтерированными агентами перекрестного сочетания и проводили мультиферментное расщепление с использованием трипсина, химотрипсина, Asp-N, эластазы и термолизина. После повышения концентрации сшитых пептидов анализировали образцы путем масс-спектрометрии с высоким разрешением (nLC-LTQ-Orbitrap MC), и анализировали полученные данные при помощи программного обеспечения XQuest и Stavrox.

Восстановительное алкилирование. Смешивали двадцать мкл смеси TNFR2/клон 25-71 с 2 мкл DSS d0/d12 (2 мг/мл; ДМФА) в течение 180 минут при инкубации при комнатной температуре. После инкубации останавливали реакцию, добавляя 1 мкл бикарбоната аммония (конечная концентрация 20 мМ), после чего инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем сушили раствор при помощи Speedvac, после чего добавляли суспензию 8М мочевины в H₂O (20 мкл). После смешения в раствор добавляли 2 мкл DTT (500 мМ). Затем инкубировали смесь в течение 1 часа при 37°C. После инкубации добавляли 2 мкл йодацетамида (1М), а затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темном помещении. После инкубации добавляли 80 мкл протеолитического буфера. Буфер для трипсина содержал 50 мМ Ambic pH 8,5, 5% ацетонитрила, буфер для химотрипсина содержал Tris HCl 100 мМ, CaCl₂ 10 мМ pH 7,8, буфер для ASP-N содержал фосфатный буфер 50 мМ pH 7,8, буфер для эластазы содержал Tris HCl 50 мМ pH 8,0, и буфер для термолизина содержал Tris HCl 50 мМ, CaCl₂ 0,5 мМ pH 9,0.

Для протеолиза трипсином смешивали 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного TNFR2/25-71 с 0,5 мкл трипсина (Promega) при отношении 1/100 и инкубировали протеолитические смеси в течение ночи при 37°C. Для протеолиза химотрипсином смешивали 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного TNFR2/25-71 с 0,25 мкл химотрипсина (Promega) при отношении 1/200 и инкубировали протеолитические смеси в течение ночи при 25°C. Для протеолиза ASP-N смешивали 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного TNFR2/25-71 с 0,25 мкл ASP-N (Promega) при отношении 1/200 и инкубировали протеолитические смеси в течение ночи при 37°C. Для протеолиза эластазой смешивали 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного TNFR2/25-71 с 0,5 мкл эластазы (Promega) при отношении 1/100 и инкубировали протеолитические смеси в течение ночи при 37°C. Для протеолиза термолизином смешивали 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного TNFR2/25-71 с 1 мкл термолизина (Promega) при отношении 1/50 и инкубировали протеолитические смеси в течение ночи при 70°C. После расщепления в раствор добавляли 1% муравьиную кислоту. Анализировали сшитые пептиды при помощи программного обеспечения Xquest версии 2.0 и Stavrox 3.6.

Результаты. После протеолиза трипсином, химотрипсином, ASP-N, эластазой и термолизином комплексов TNFR2/25-71 с дейтерированным d0d12 в анализе MC/MC nLC-orbitrap обнаруживали 12 пептидов, образованных в результате перекрестного сочетания TNFR2 и клона 25-71. При помощи химического перекрестного сочетания, масс-спектрометрии MALDI для высокомолекулярных частиц и масс-спектрометрии nLC-Orbitrap была описана граница раздела между TNFR2 и антителом 25-71 на молекулярном уровне. Результаты указанного анализа проиллюстрированы на **фигуре 16** и **фигурах 17А-17J**, на которых указано, что взаимодействие TNFR2/25-71 включает следующие остатки **полноразмерного** TNFR2 человека; R43, Y45, T49, S55, K56, T73 и S77; или следующие остатки **зрелого** TNFR2 человека; R21, Y23, T27, S33, K34, T51 и S55.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:1-3; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:4-6;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:7-9; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:10-12;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:13-15; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:16-18;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:19-21; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:22-24;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:25-27; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:28-30;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:31-33; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:34-36;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:37-39; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:40-42;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:43-45; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:46-48;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:49-51; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:52-54;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:55-57; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:58-60;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:61-63; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:64-66;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:67-69; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:70-72;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:73-75; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:76-78;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:79-81; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:82-84;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:85-87; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:88-90;

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:91-93; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:94-96; или

область VH, содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:97-99; и область VL, содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:100-102;

или вариант указанного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепей, идентичные вариабельным участкам тяжелой и легкой цепей (i) и (ii) за исключением наличия вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотных замен в указанных CDR-участках.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где указанная область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133 и 135.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 1 или 2, где указанная область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 134 и 136.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 2 или 3, содержащее:

область VH, представленную в SEQ ID NO:103, и область VL, представленную в SEQ ID NO:104;

область VH, представленную в SEQ ID NO:105, и область VL, представленную в SEQ ID NO:106;

область VH, представленную в SEQ ID NO:107, и область VL, представленную в SEQ ID NO:108;

область VH, представленную в SEQ ID NO:109, и область VL, представленную в SEQ ID NO:110;

область VH, представленную в SEQ ID NO:111, и область VL, представленную в SEQ ID NO:112;

область VH, представленную в SEQ ID NO:113, и область VL, представленную в

SEQ ID NO:114;

область VH, представленную в SEQ ID NO:115, и область VL, представленную в SEQ ID NO:116;

область VH, представленную в SEQ ID NO:117, и область VL, представленную в SEQ ID NO:118;

область VH, представленную в SEQ ID NO:119, и область VL, представленную в SEQ ID NO:120;

область VH, представленную в SEQ ID NO:121, и область VL, представленную в SEQ ID NO:122;

область VH, представленную в SEQ ID NO:123, и область VL, представленную в SEQ ID NO:124;

область VH, представленную в SEQ ID NO:125, и область VL, представленную в SEQ ID NO:126;

область VH, представленную в SEQ ID NO:127, и область VL, представленную в SEQ ID NO:128;

область VH, представленную в SEQ ID NO:129, и область VL, представленную в SEQ ID NO:130;

область VH, представленную в SEQ ID NO:131, и область VL, представленную в SEQ ID NO:132;

область VH, представленную в SEQ ID NO:133, и область VL, представленную в SEQ ID NO:134; или

область VH, представленную в SEQ ID NO:135, и область VL, представленную в SEQ ID NO:136.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, и 135, и соответственно, варибельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO:104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 134, и 136.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли (TNFR2), содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R1**; и, соответственно, варибельную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, выбранные из подчеркнутых последовательностей в **таблице R2**.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, содержащее область VH, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из **таблицы R1**, и, соответственно, область VL, которая содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из **таблицы R2**.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает рецептор 2 фактора некроза опухоли человека (TNFR2) в эпитопе, который содержит, состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из R21, Y23, T27, S33, K34, T51, и S55, как определено для последовательности зрелого TNFR2 человека (остатки 23-461 FL TNFR2 человека), причем необязательно эпитоп содержит, состоит из или состоит по существу из одного или более остатков, выбранных из REY, TAQMCCSK (SEQ ID NO:328) и TVCDS (SEQ ID NO:329).

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую участки VHCDR1, VHCDR2 и VHCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:37-39, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую участки VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3, представленные, соответственно, в SEQ ID NO:40-42.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 8 или 9, где указанная область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:115.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 8-10, где указанная область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO:116.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 10 или 11, содержащее область VH, представленную в SEQ ID NO:115, и область VL, представленную в SEQ ID NO:116.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, которое связывает TNFR2 человека, необязательно растворимый и экспрессируемый в клетках TNFR2 человека.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, которое связывает по меньшей мере один, два, три, четыре или пять пептидных эпитопов TNFR2 человека, выбранных из **таблицы T1**.

15. Выделенное антитело по любому из пп. 1-14, где указанное антитело является гуманизированным.

16. Выделенное антитело по любому из пп. 1-15, где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из одноцепочечного антитела, scFv, одновалентного антитела, в котором отсутствует шарнирная область, мини-антитела и про-антитела.

17. Выделенное антитело по любому из пп. 1-15, где указанное антитело представляет собой фрагмент Fab или Fab'.

18. Выделенное антитело по любому из пп. 1-15, где указанное антитело представляет собой фрагмент F(ab')₂.

19. Выделенное антитело по любому из пп. 1-15, где указанное антитело представляет собой полное антитело.

20. Выделенное антитело по любому из пп. 1-19, содержащее константный домен

IgG человека.

21. Выделенное антитело по п. 20, где указанный константный домен IgG содержит CH1-домен IgG1.

22. Выделенное антитело по п. 20, где указанный константный домен IgG содержит Fc-область IgG1, необязательно модифицированную Fc-область, необязательно модифицированную одной или более аминокислотными заменами.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22, которое связывает TNFR2 человека, необязательно по меньшей мере один пептидный эпитоп из **таблицы Т1** при K_D примерно 2 нМ или менее.

24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, которое связывает TNFR2 человека при K_D примерно 0,7 нМ или менее или связывает TNFR2 человека в первичных Т-клетках, необязательно в T_{reg} , при K_D примерно 50 пМ или менее.

25. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-24, где указанное выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

- (a) ингибирует связывание ФНО- α с TNFR2;
- (b) ингибирует передачу сигнала TNFR2;
- (c) активирует передачу сигнала TNFR2;
- (d) ингибирует димеризацию/тримеризацию TNFR2;
- (e) перекрестно связывает TNFR2 человека и TNFR2 яванского макака;
- (f) усиливает/индуцирует уничтожение/истощение опухолевых клеток, T_{reg} и/или супрессорных миелоидных клеток (необязательно макрофагов, нейтрофилов и миелоидных супрессорных клеток (МСК)) посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ);
- (g) усиливает/индуцирует уничтожение/истощение опухолевых клеток, T_{reg} и/или супрессорных миелоидных клеток (необязательно макрофагов, нейтрофилов и МСК) посредством опосредованного макрофагами антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ);
- (h) снижает подавление иммунной системы миелоидными клетками (необязательно макрофагами, нейтрофилами и МСК);
- (i) превращает МСК и/или макрофаги М2 в провоспалительные макрофаги М1;
- (j) превращает T_{reg} в эффекторные Т-клетки;
- (k) превращает «холодные» опухоли в «горячие» опухоли;
- (l) снижает подавление иммунной системы, опосредованное T_{reg} ; или
- (m) комбинацию любого одного или более из (a)-(k).

26. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-25, которое по существу не связывает TNFR1, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), CD40, рецептор смерти 6 (DR6) и/или остеопротегерин (OPG).

27. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, которое представляет собой антагонист TNFR2.

28. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-26, которое представляет собой агонист TNFR2.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-28, которое представляет собой биспецифическое или полиспецифическое антитело.

30. Выделенный полинуклеотид, кодирующий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид, или выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор.

31. Композиция, содержащая физиологически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-29.

32. Способ лечения пациента, страдающего от рака, необязательно рака, связанного с нарушенной экспрессией TNFR2, включающий введение пациенту композиции по п. 31 для лечения тем самым рака.

33. Способ лечения пациента, страдающего от рака, необязательно рака, связанного с подавлением иммунной системы, опосредованным антагонистом TNFR2, включающий введение пациенту композиции по п. 31 для лечения тем самым рака.

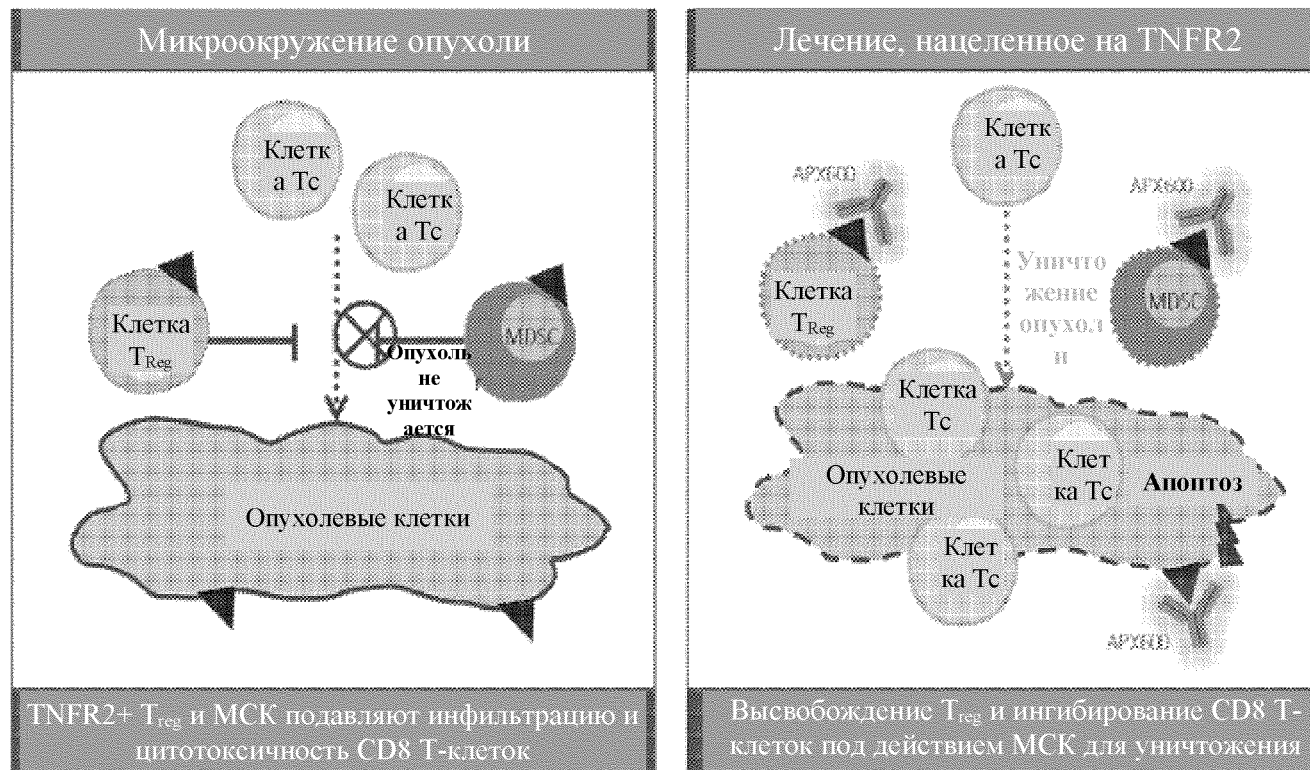
34. Способ по пп. 32 или 33, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист TNFR2.

35. Способ лечения пациента, страдающего от воспалительного и/или аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту композиции по п. 31 для лечения тем самым воспаления.

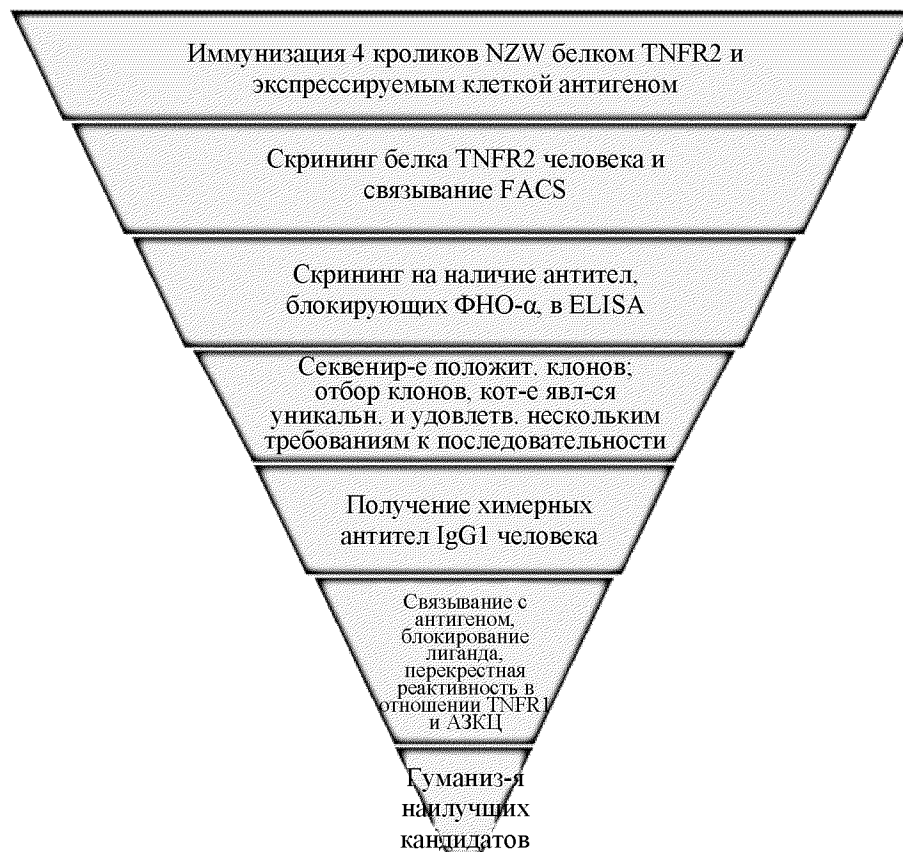
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что указанное заболевание связано с нарушенной экспрессией TNFR2, причем необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой агонист TNFR2.

37. Способ по п. 35, отличающийся тем, что указанное заболевание связано с активацией иммунной системы, опосредованной агонистом TNFR2.

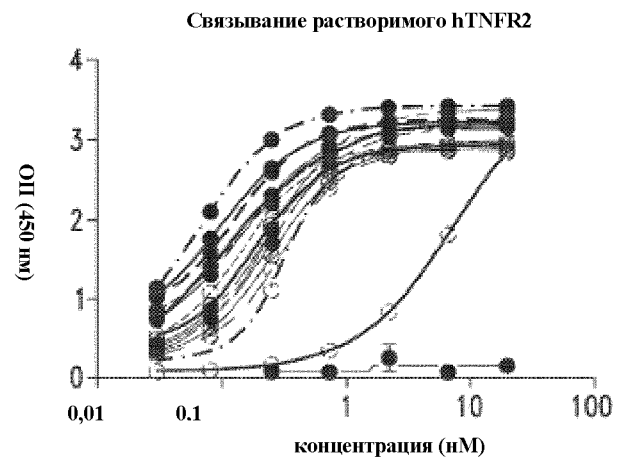
По доверенности



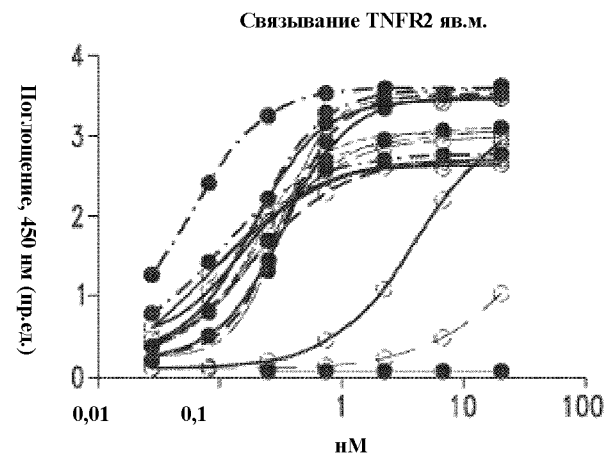
ФИГ. 1



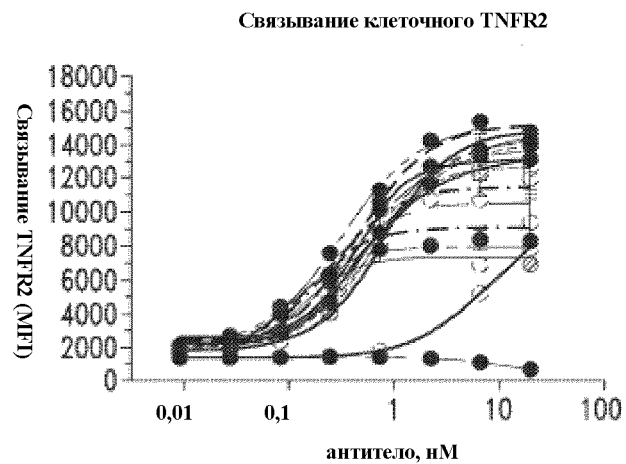
ФИГ. 2



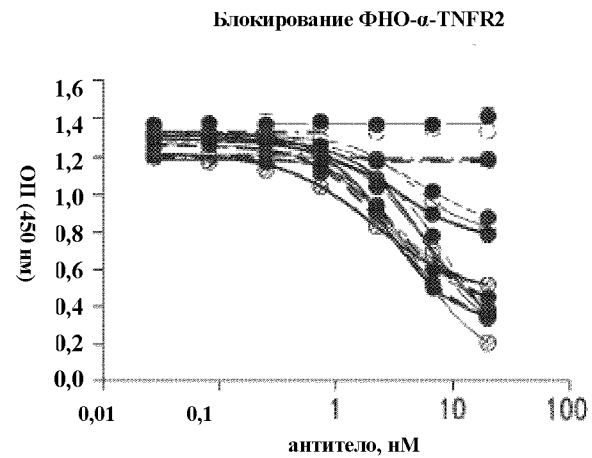
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

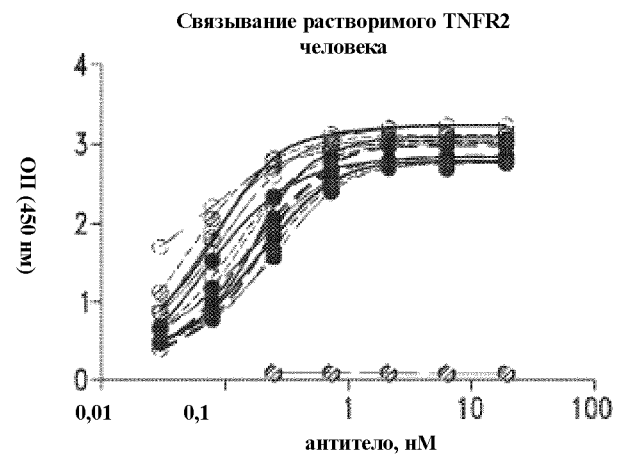


ФИГ. 3С

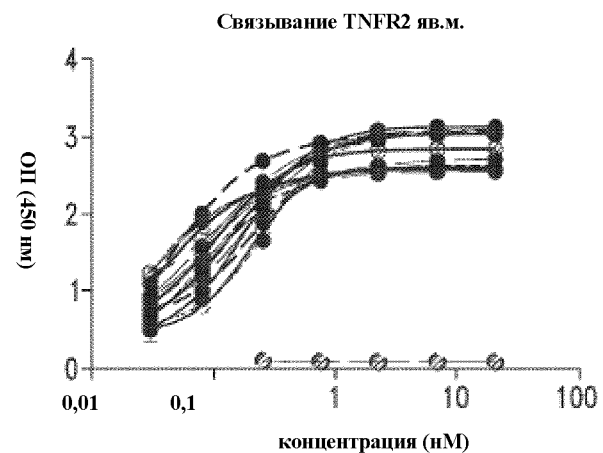


ФИГ. 3D

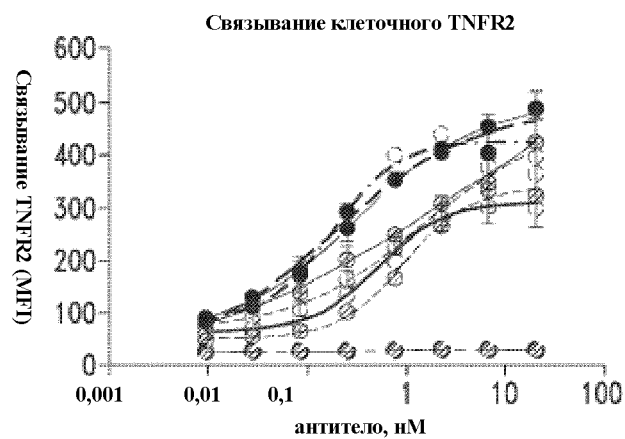
- 4
- 6
- 9
- 24
- 37
- 42
- Изотип
- 57
- 23,71
- 25,71
- 75
- 81
- 82
- 92
- 127
- 107
- 108
- 102
- SBT002d



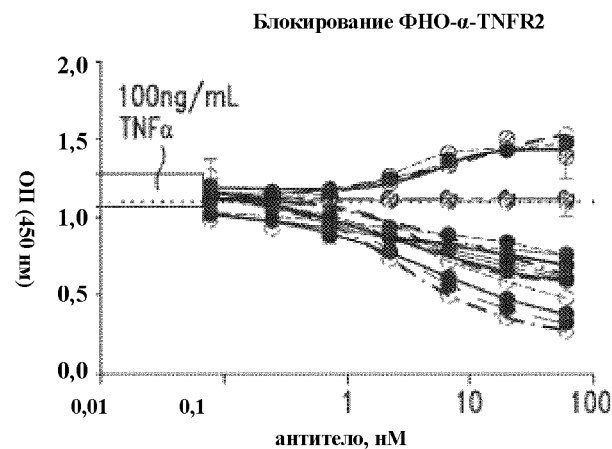
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

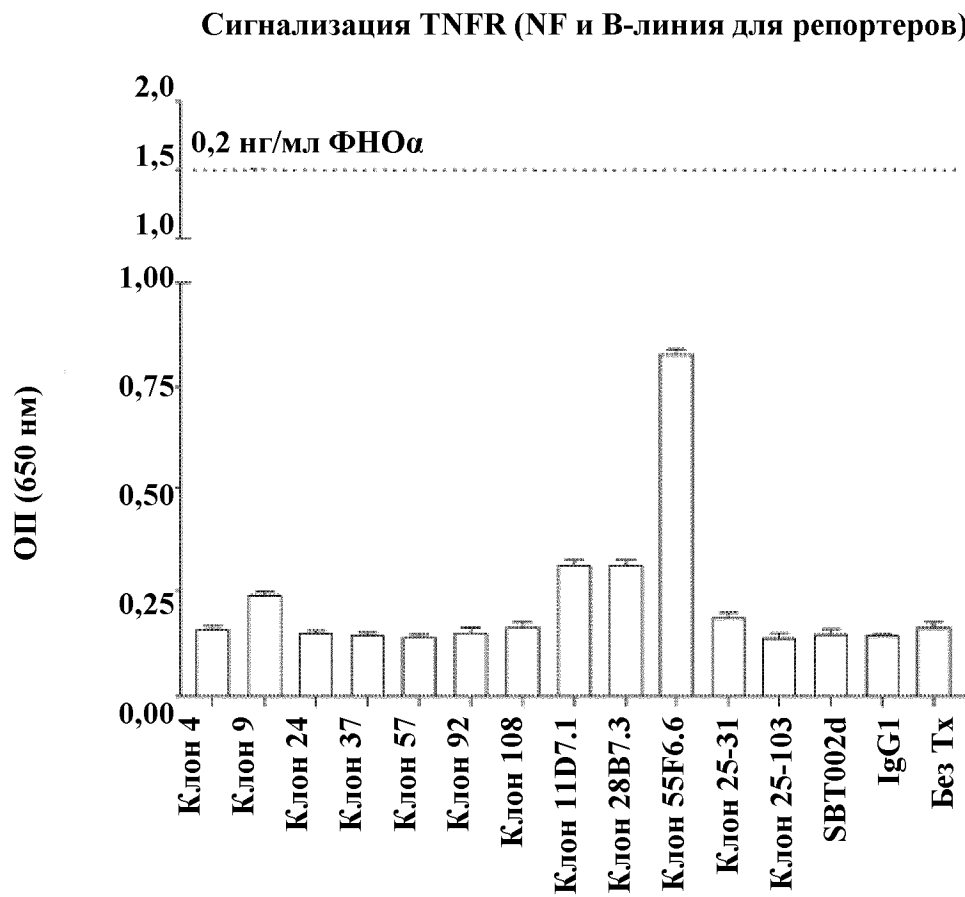


ФИГ. 4С

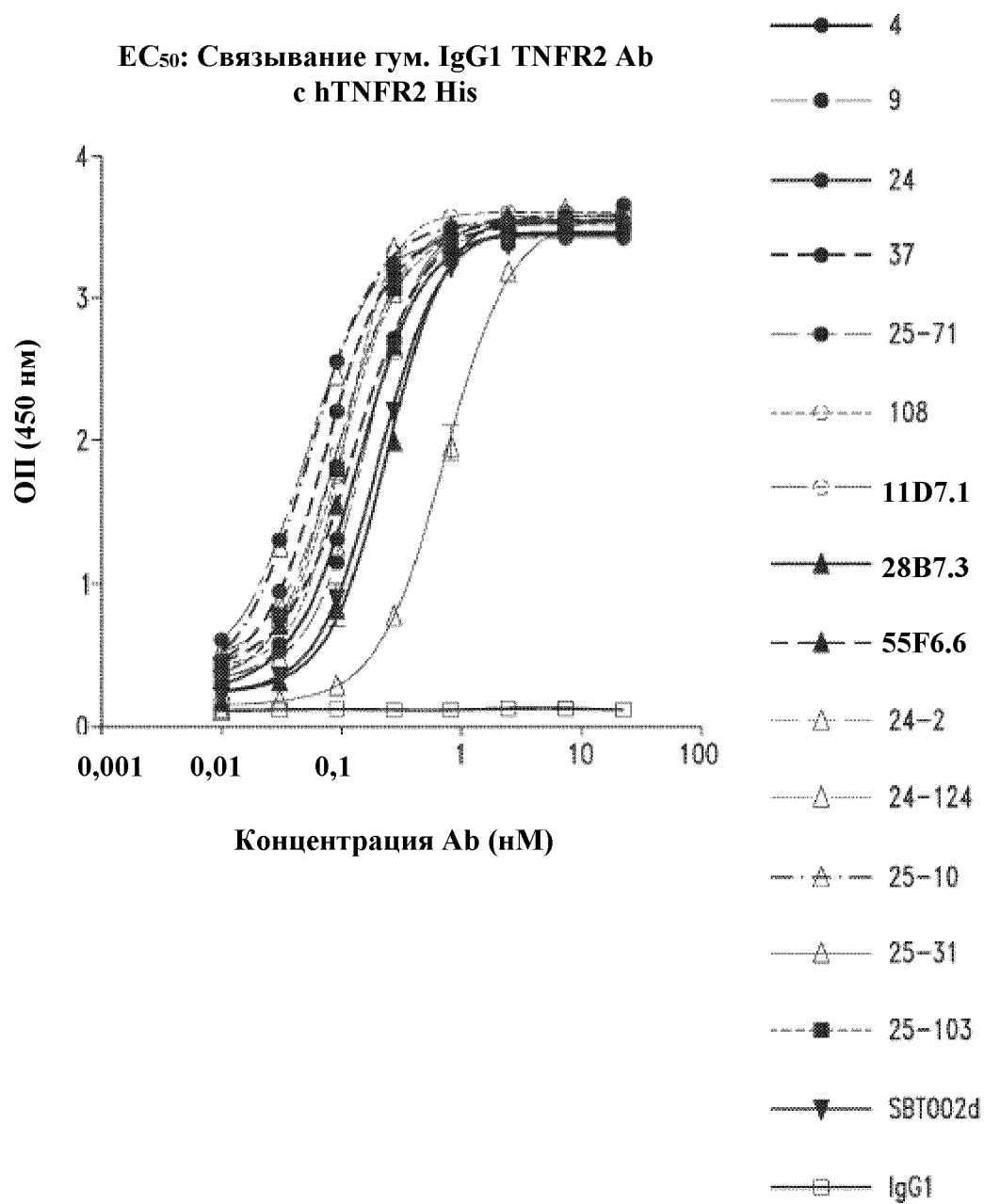


ФИГ. 4D

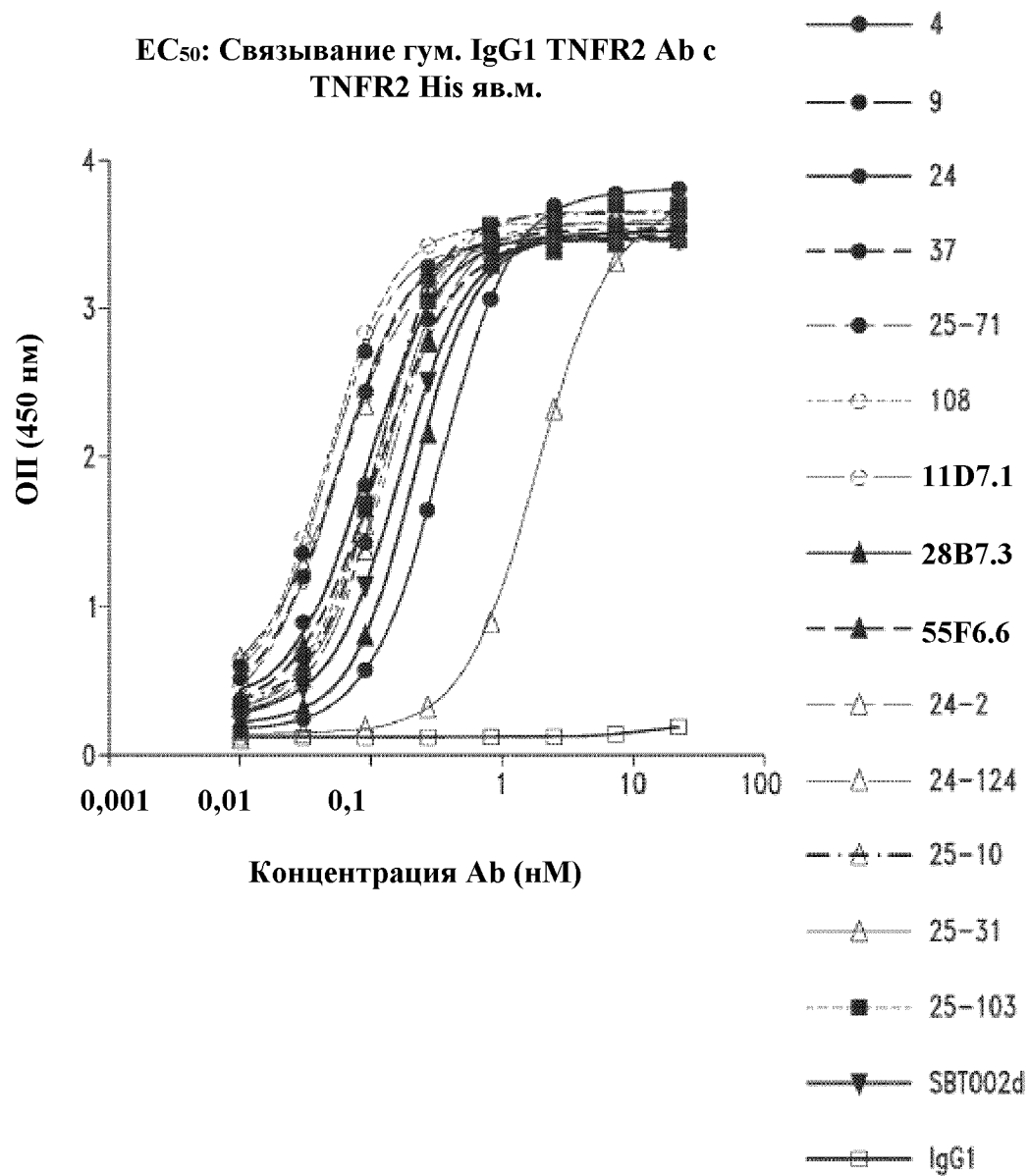
- 7H2.5
- - -●- 8G10.7
- 8G11.5
- 9B11.2
- - -●- 11D7.1
- - -●- 11G12.1
- 28B7.3
- - -●- 37D1.4
- 37H4.1
- - -○- 55F6.1
- 24-2
- 25-10
- - -○- 24-25
- 24-62
- 24-97
- - -○- 24-124
- 25-31
- - -○- 25-103
- SBT002d
- IgG1, изотипный контроль



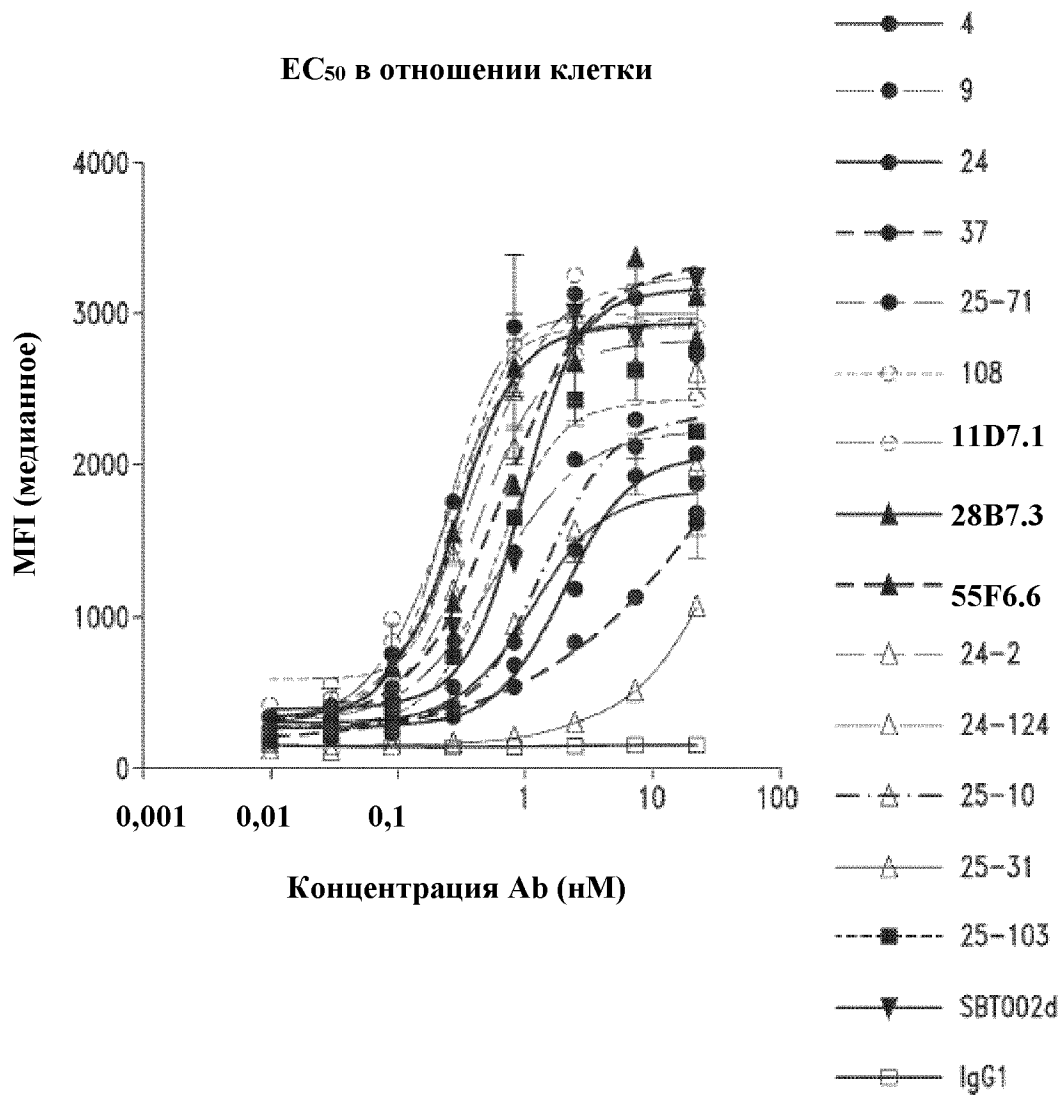
ФИГ. 5



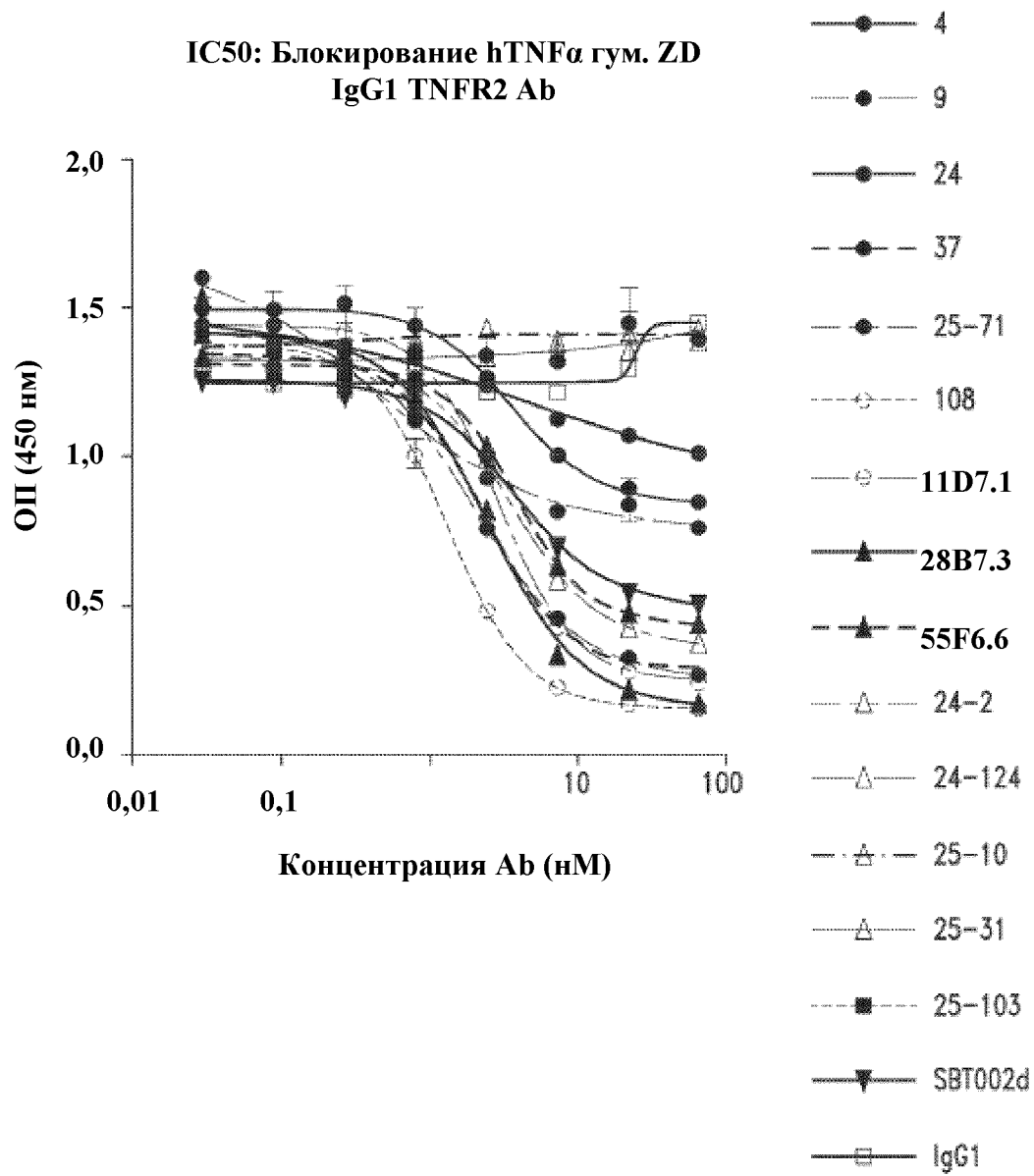
ФИГ. 6А



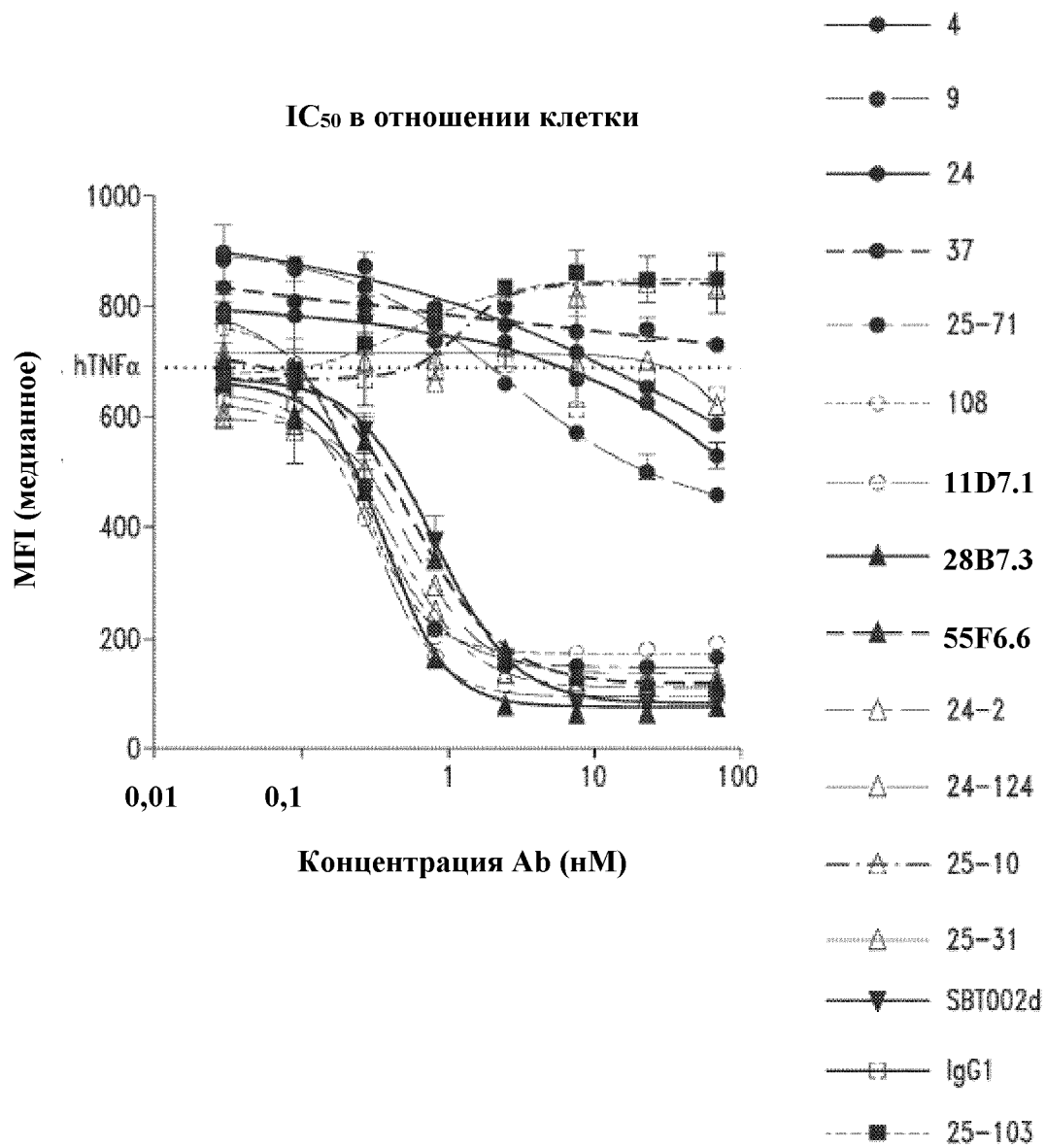
ФИГ. 6В



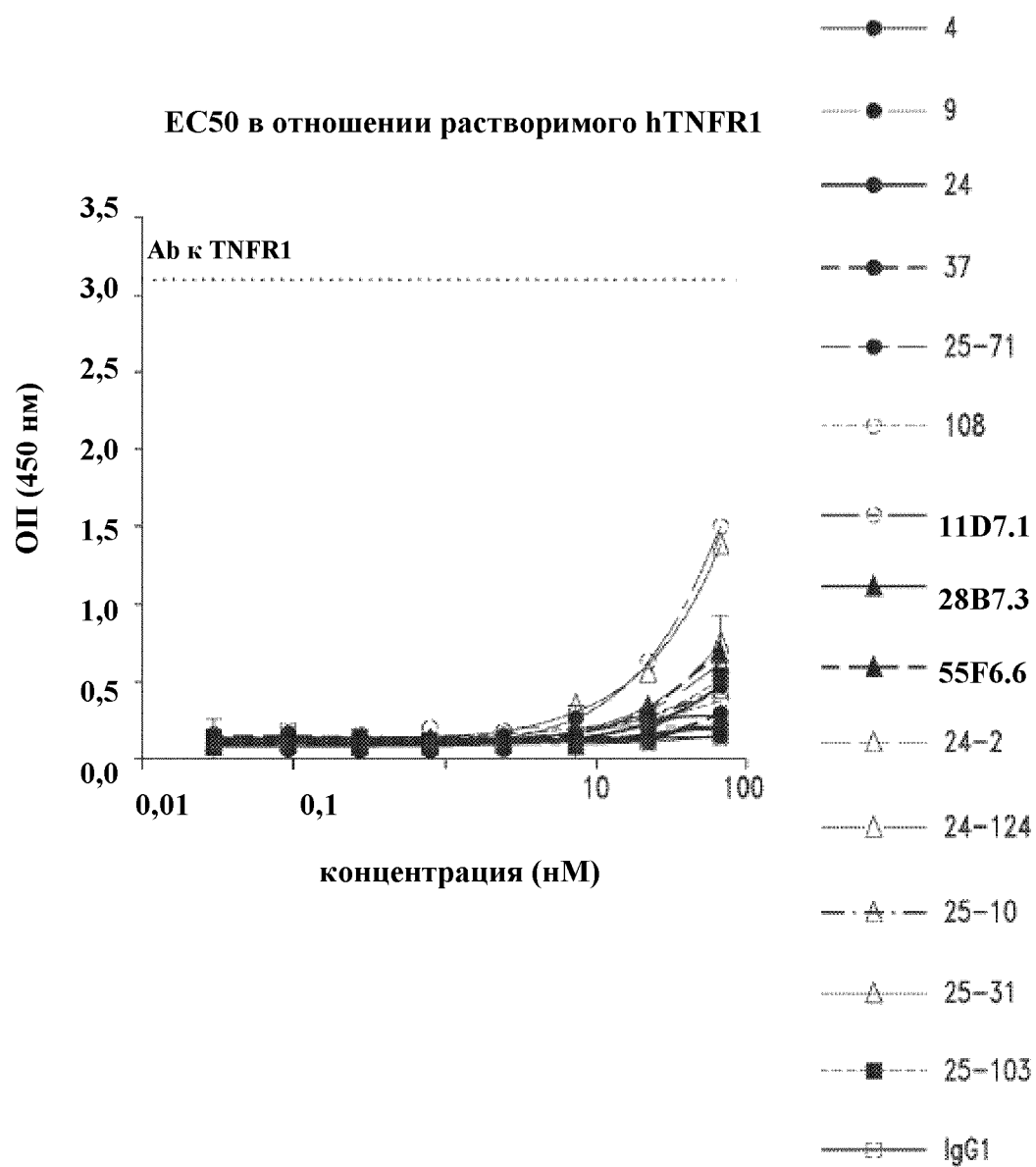
ФИГ. 6С



ФИГ. 6D

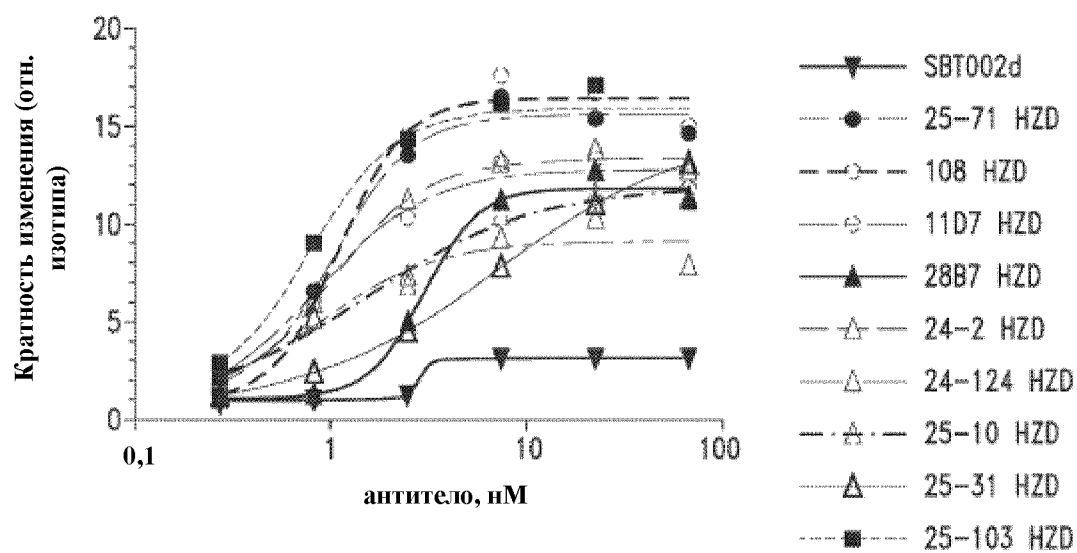


ФИГ. 7



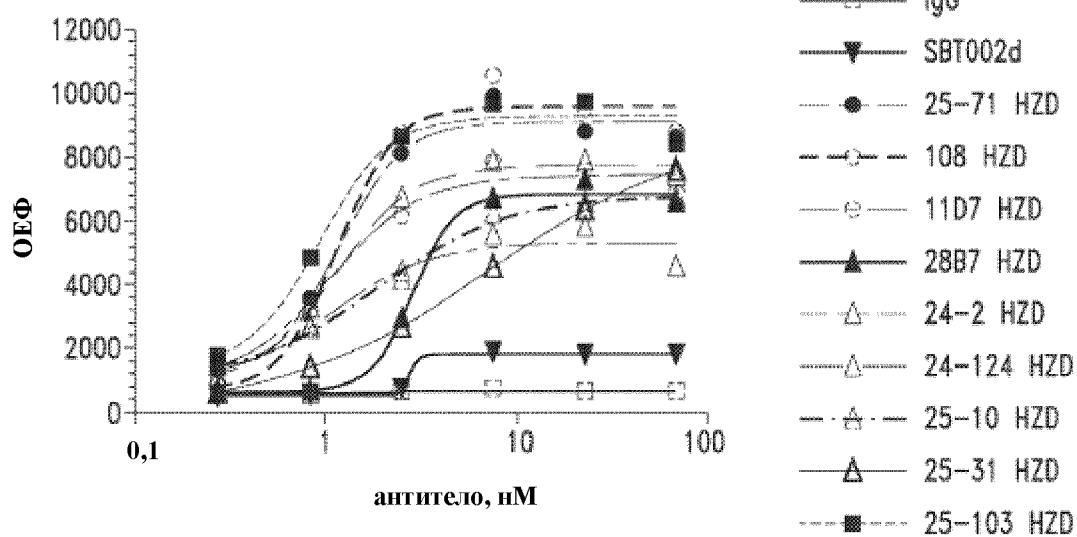
ФИГ. 8

Репортерное исследование АЗКЦ

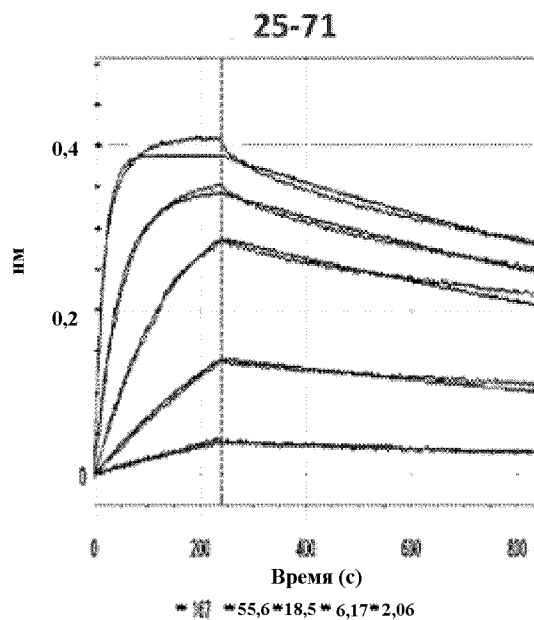


ФИГ. 9А

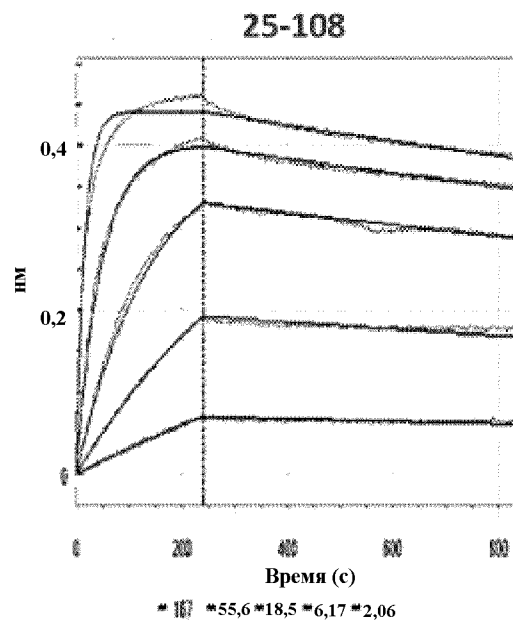
Репортерное исследование АЗКЦ



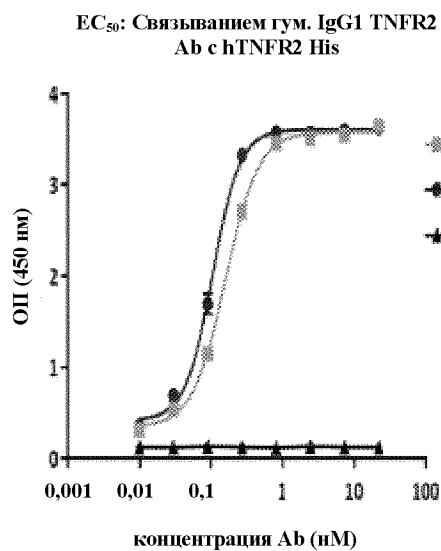
ФИГ. 9В



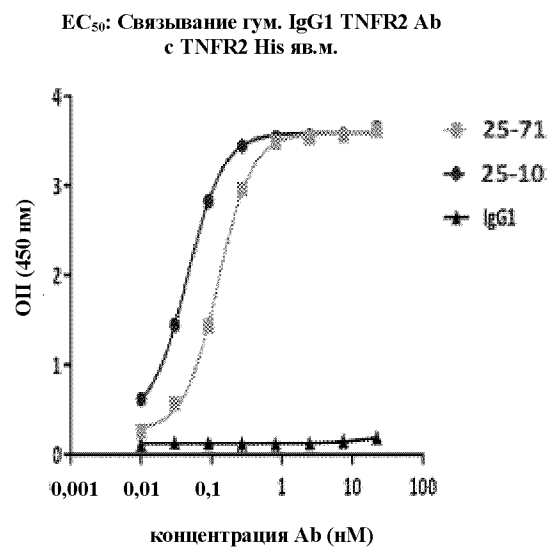
ФИГ. 10А



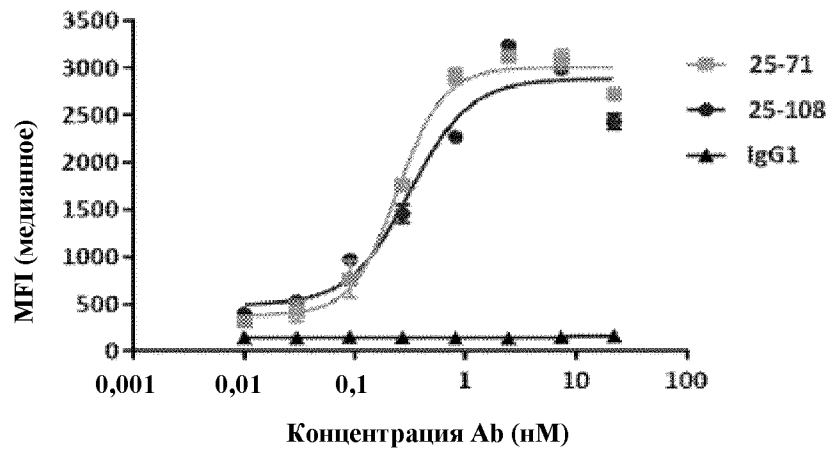
ФИГ. 10В



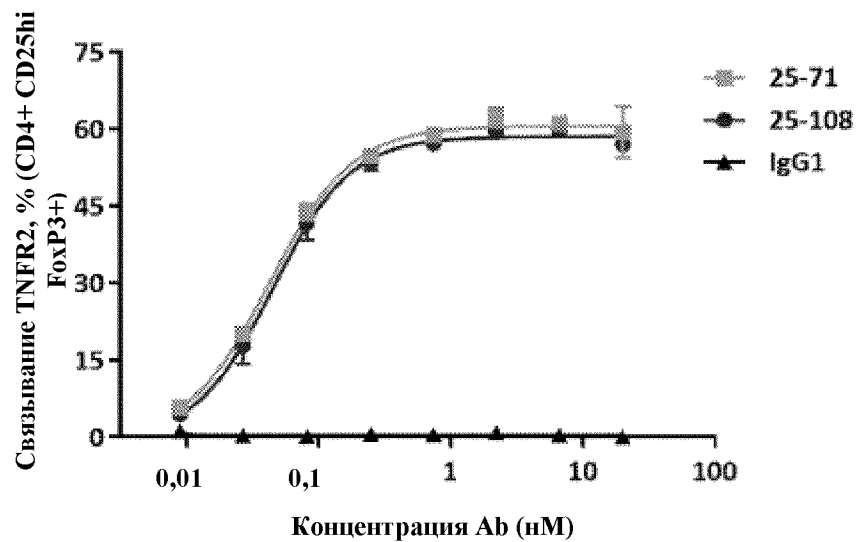
ФИГ. 10С



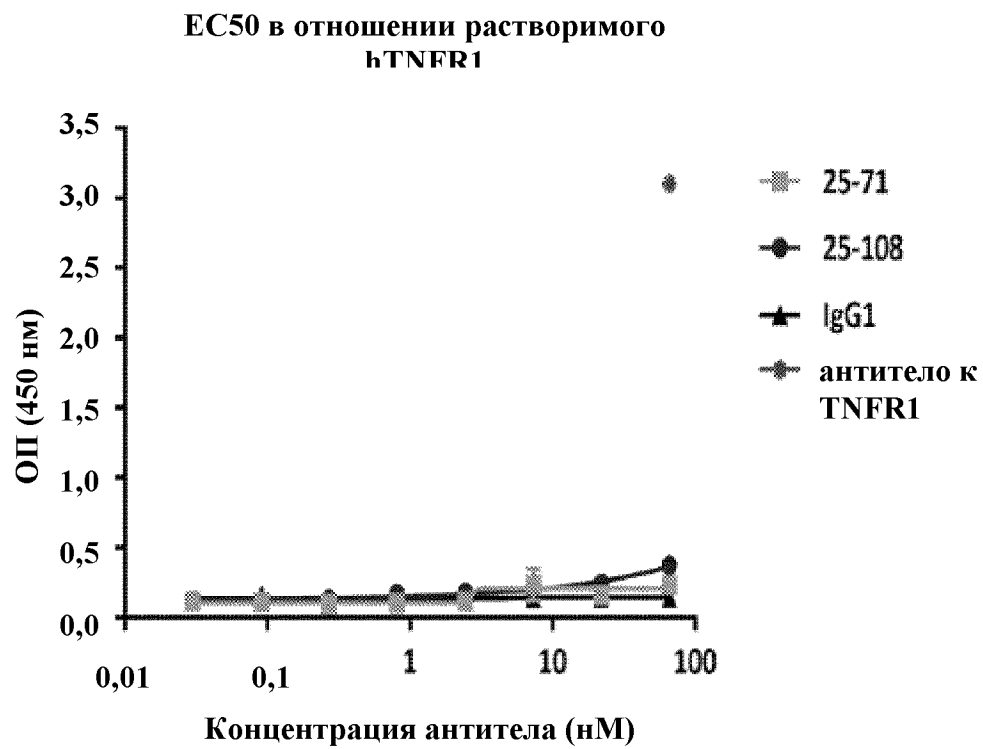
ФИГ. 10D

EC₅₀ в отношении клетки

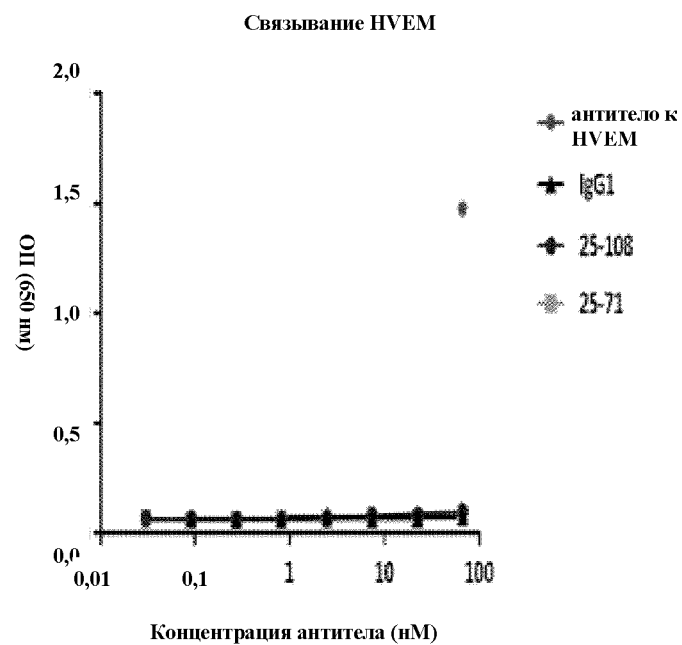
ФИГ. 10E



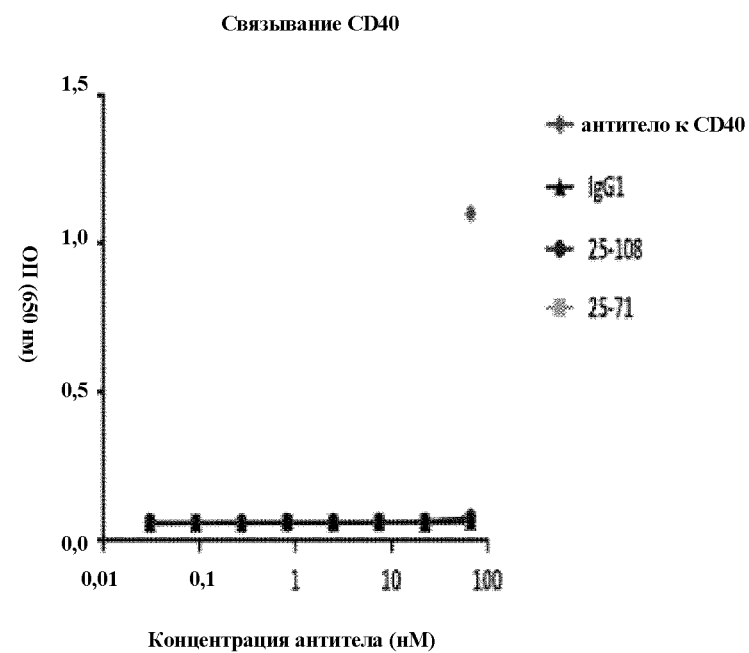
ФИГ. 10F



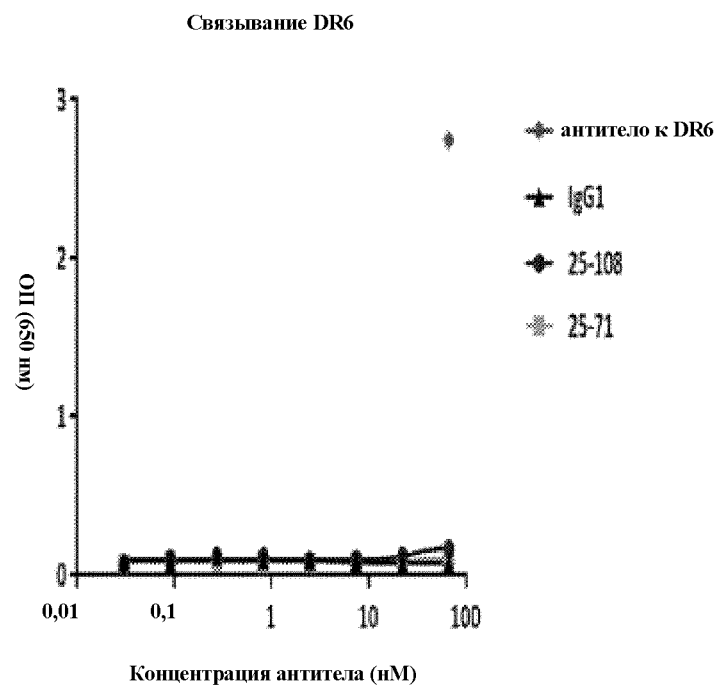
ФИГ. 11А



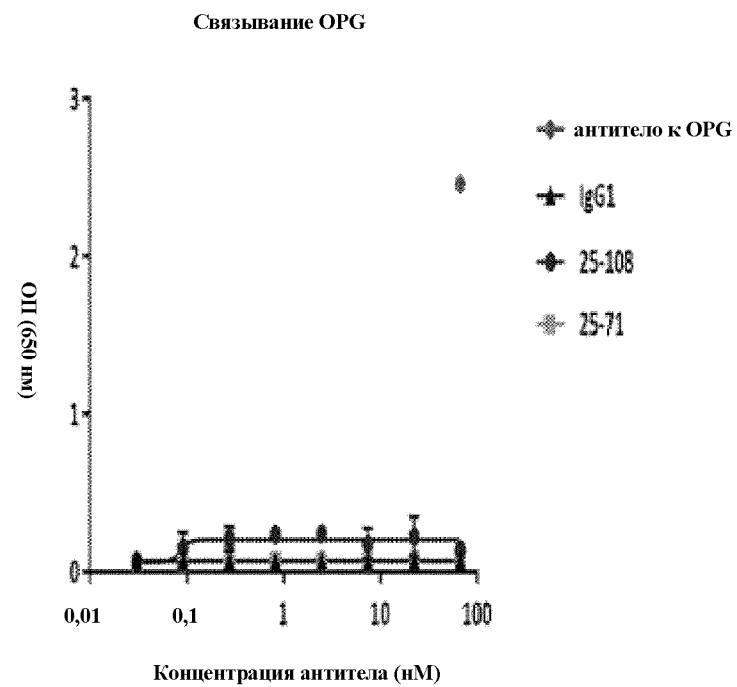
ФИГ. 11В



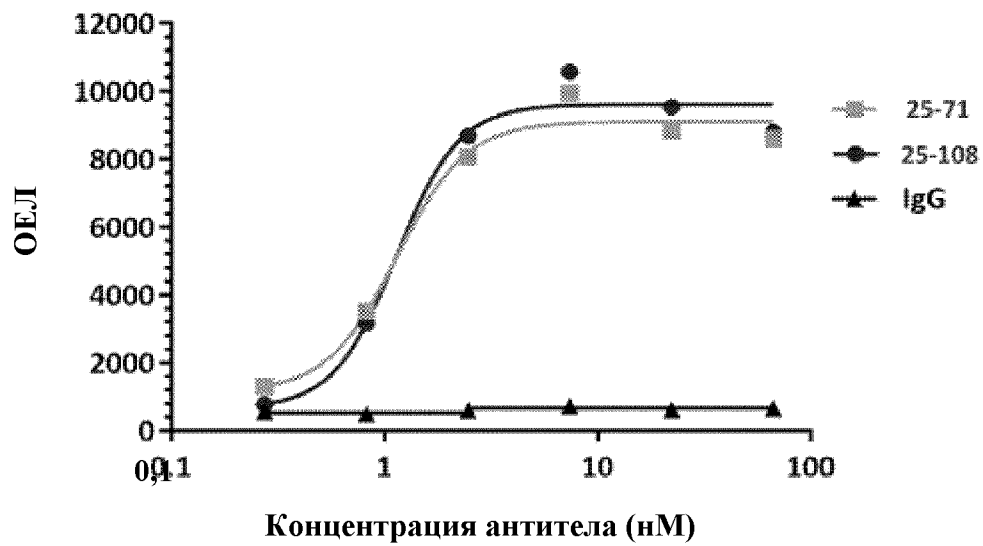
ФИГ. 11С



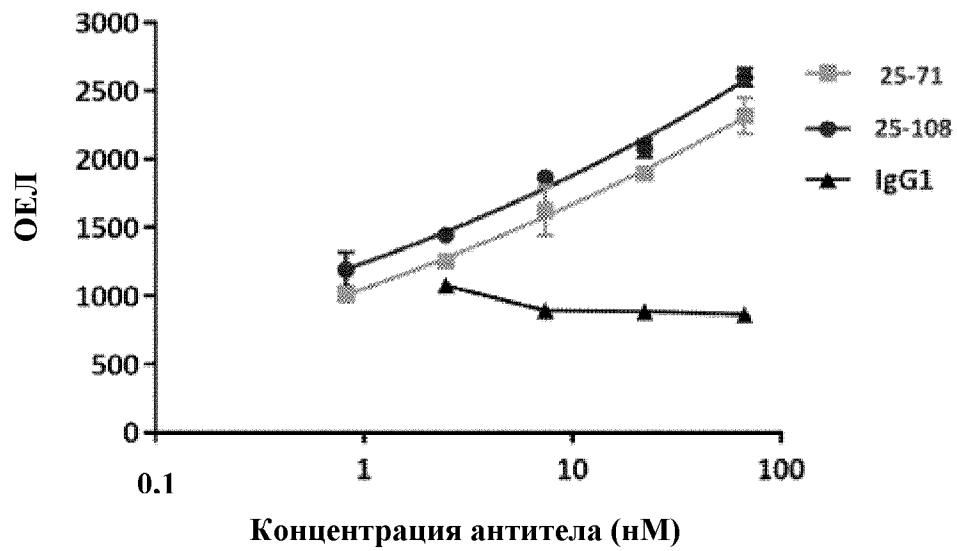
ФИГ. 11D



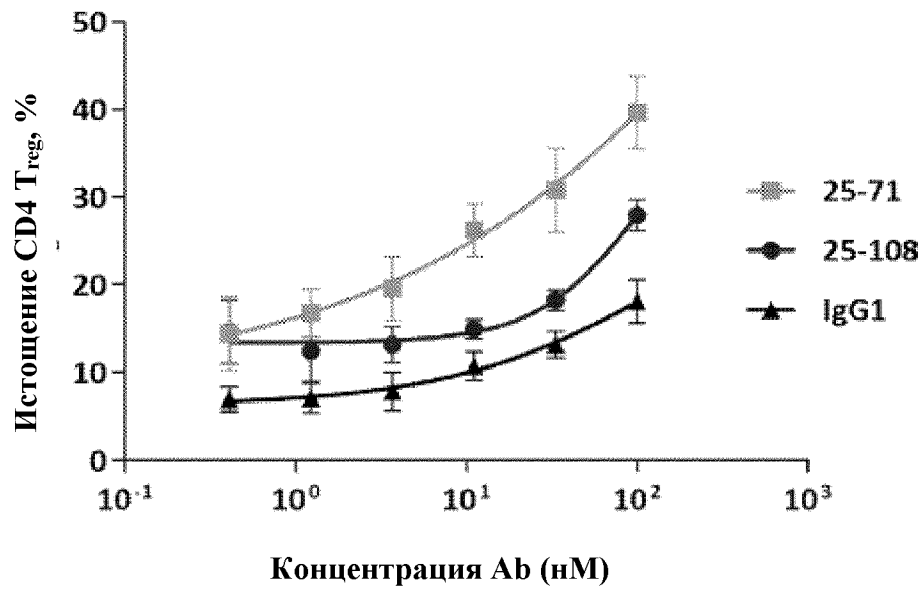
ФИГ. 11E



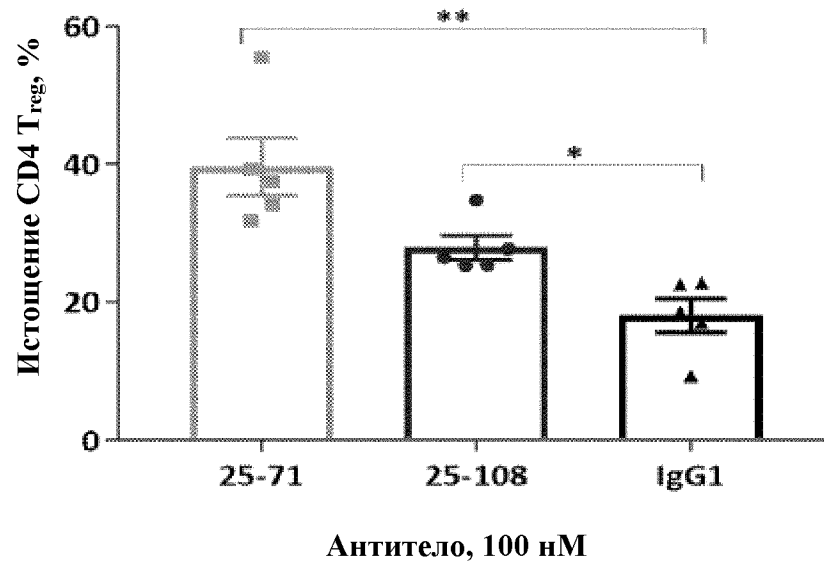
ФИГ. 12А



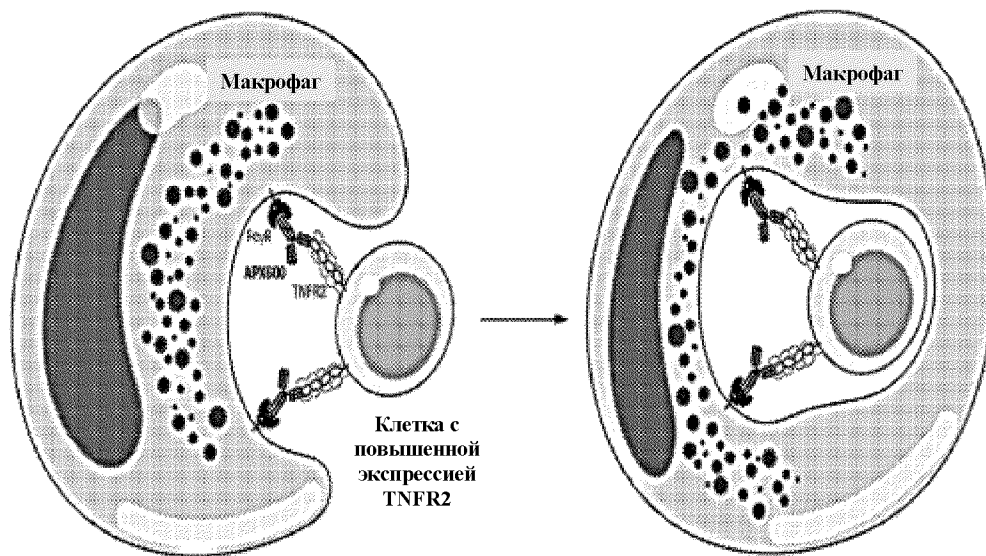
ФИГ. 12В



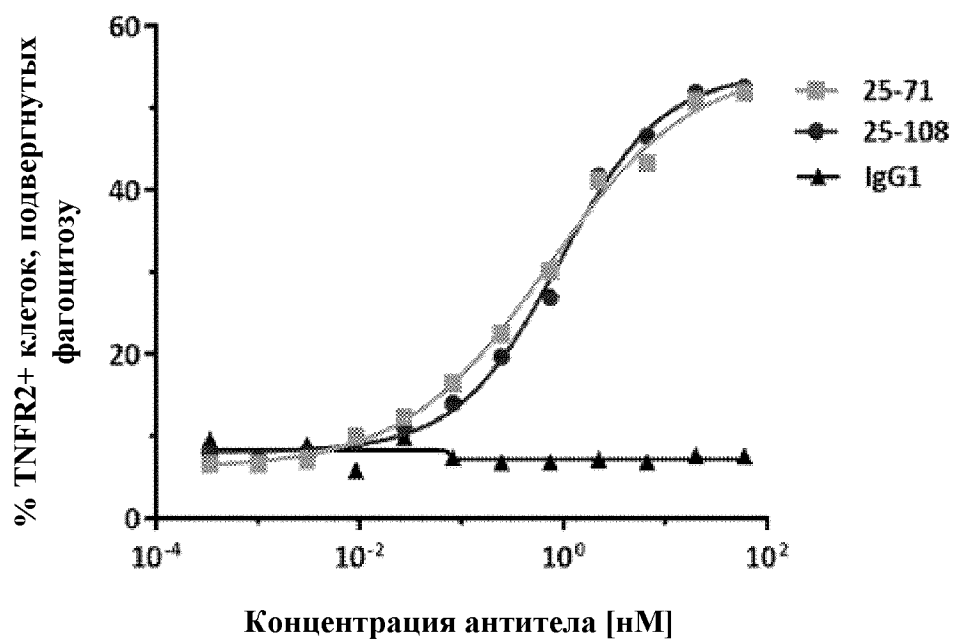
ФИГ. 13А



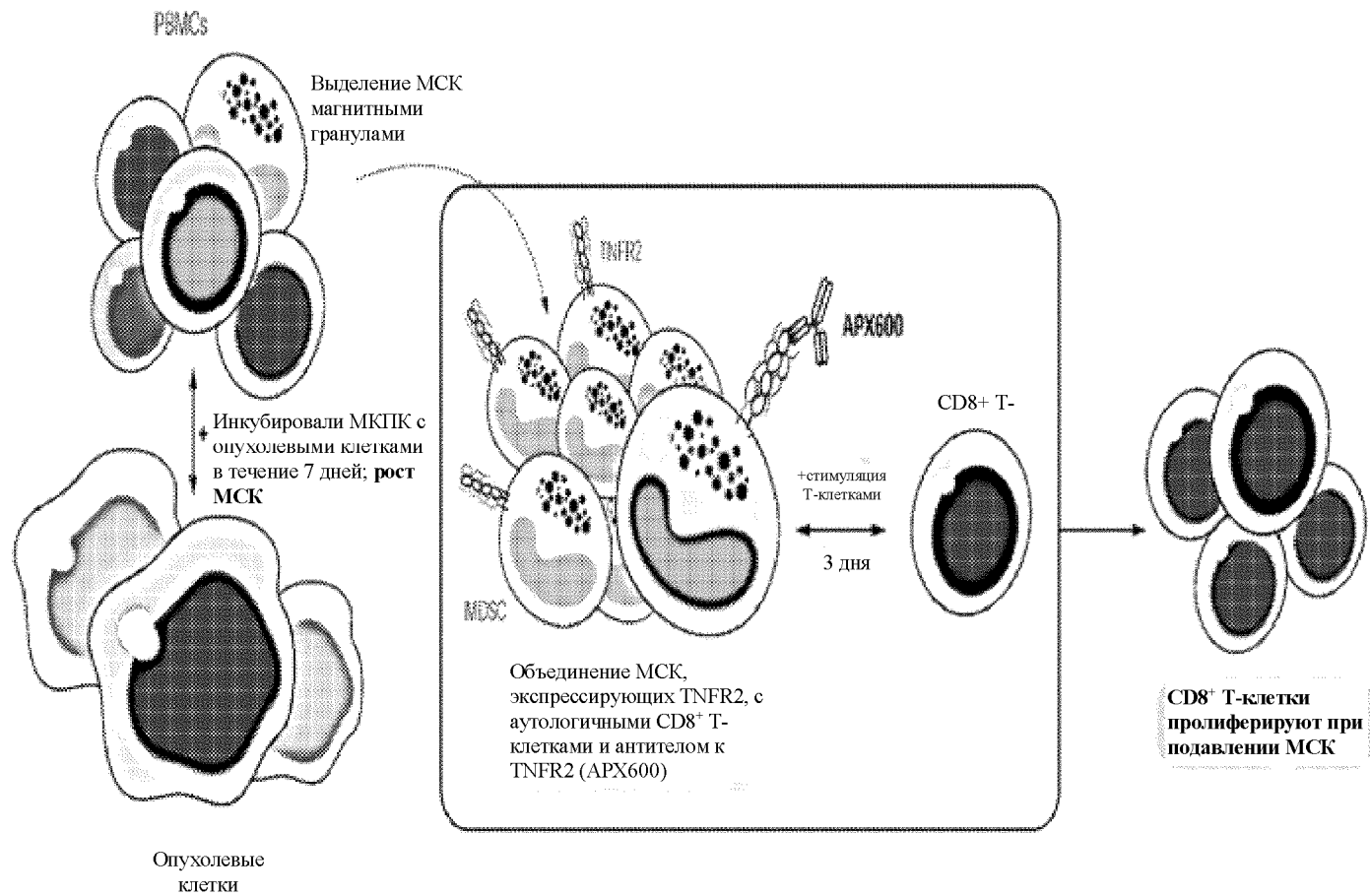
ФИГ. 13В



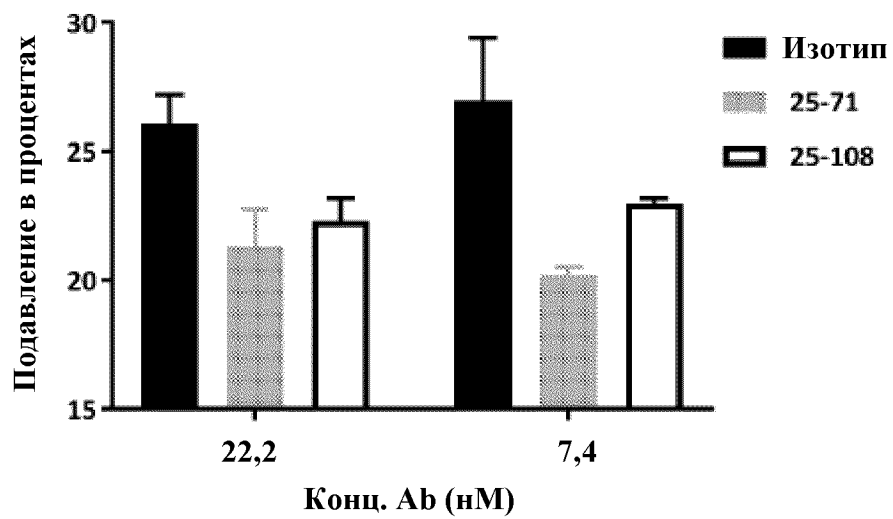
ФИГ. 14А



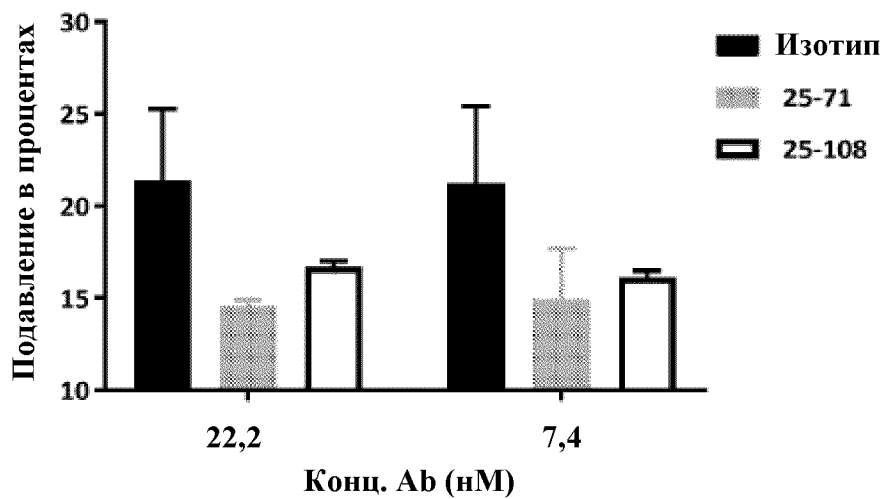
ФИГ. 14В



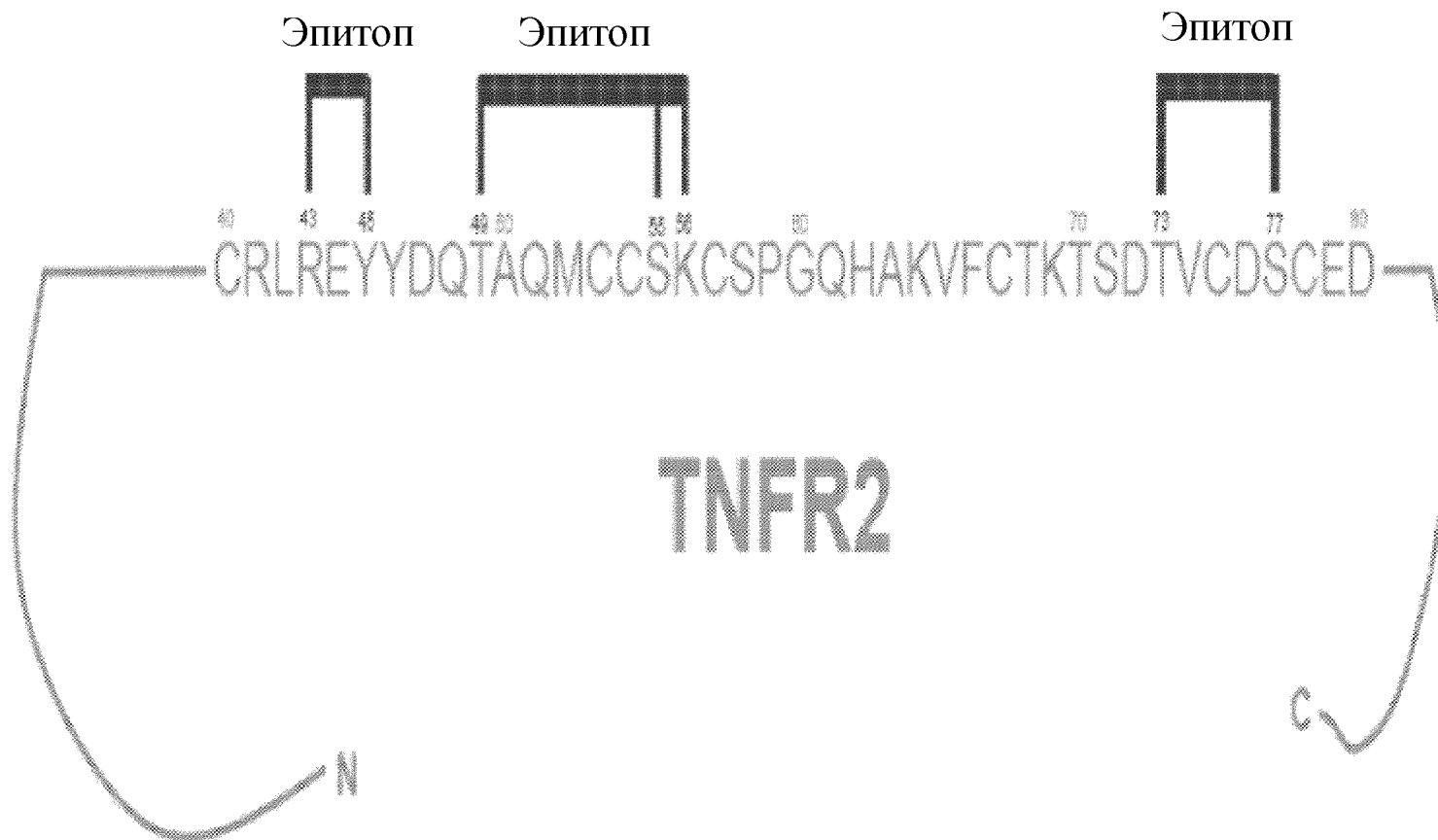
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В

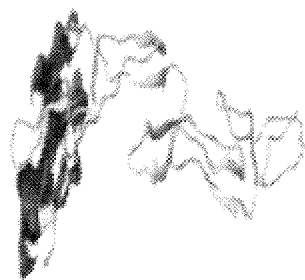


ФИГ. 15С

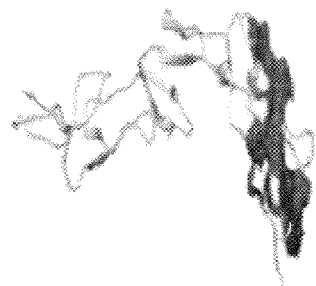


TNFR2

ФИГ. 16



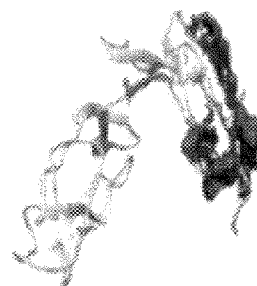
ФИГ. 17А



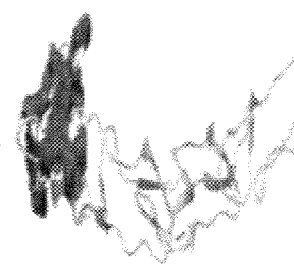
ФИГ. 17В



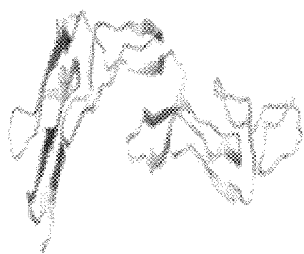
ФИГ. 17С



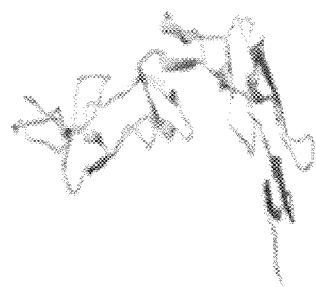
ФИГ. 17D



ФИГ. 17Е



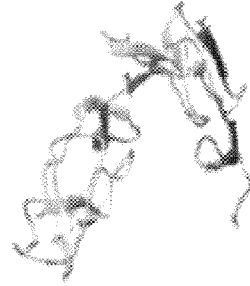
ФИГ. 17F



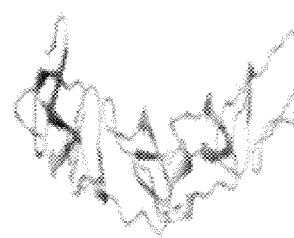
ФИГ. 17G



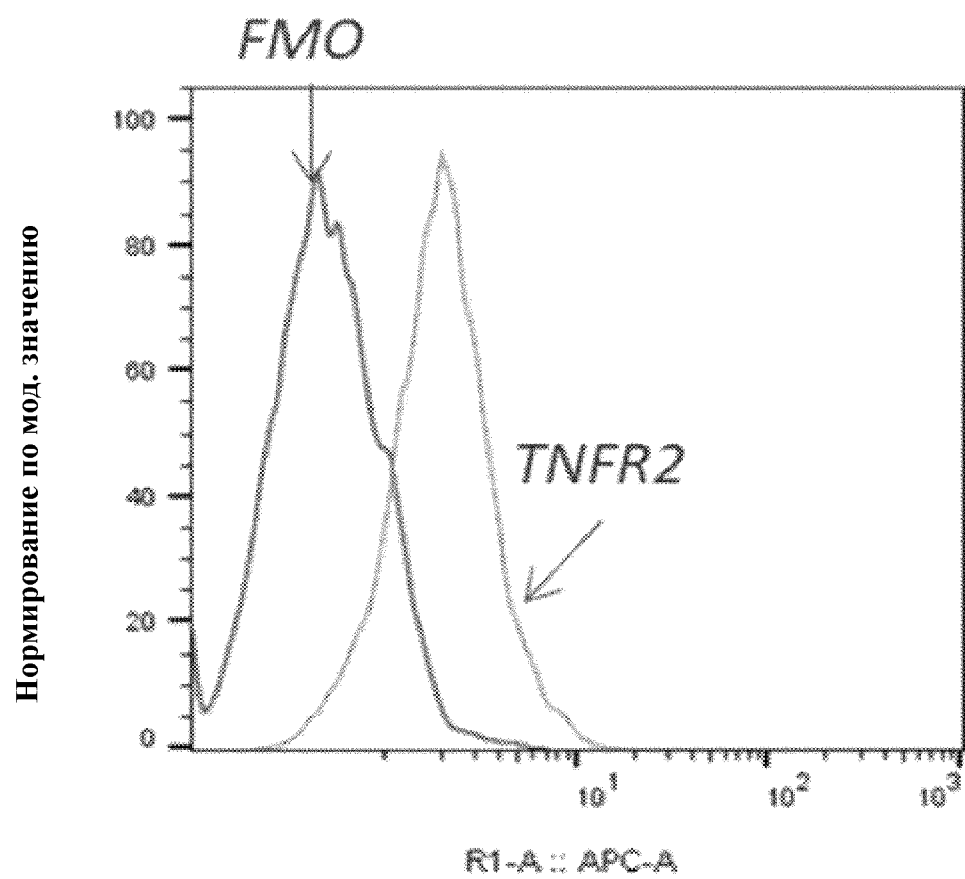
ФИГ. 17H



ФИГ. 17I

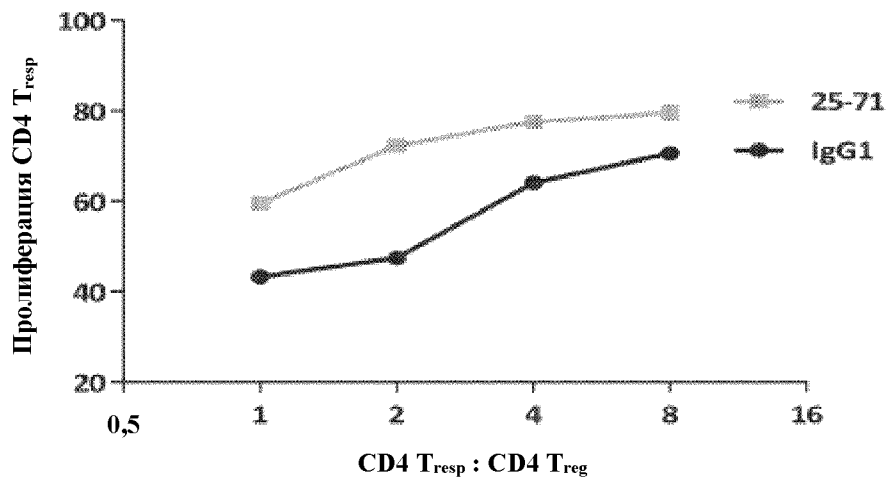


ФИГ. 17J



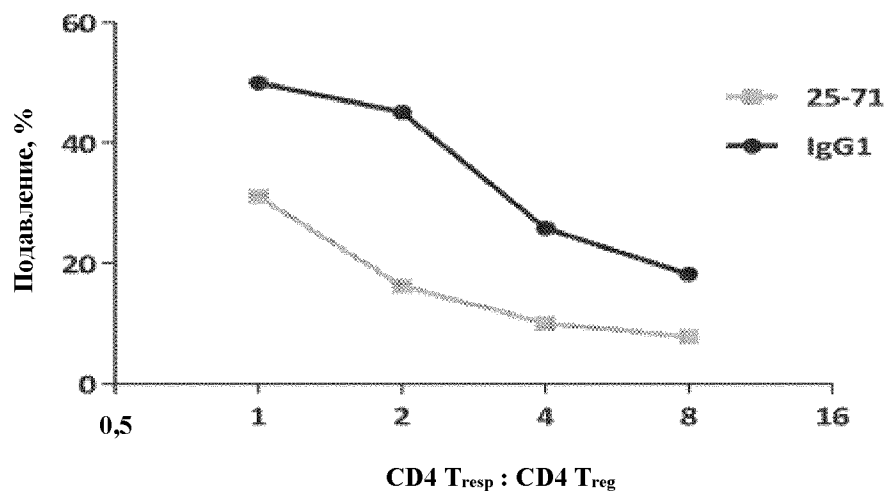
ФИГ. 18А

Проллиферация CD4 T-клеток в процентах



ФИГ. 18В

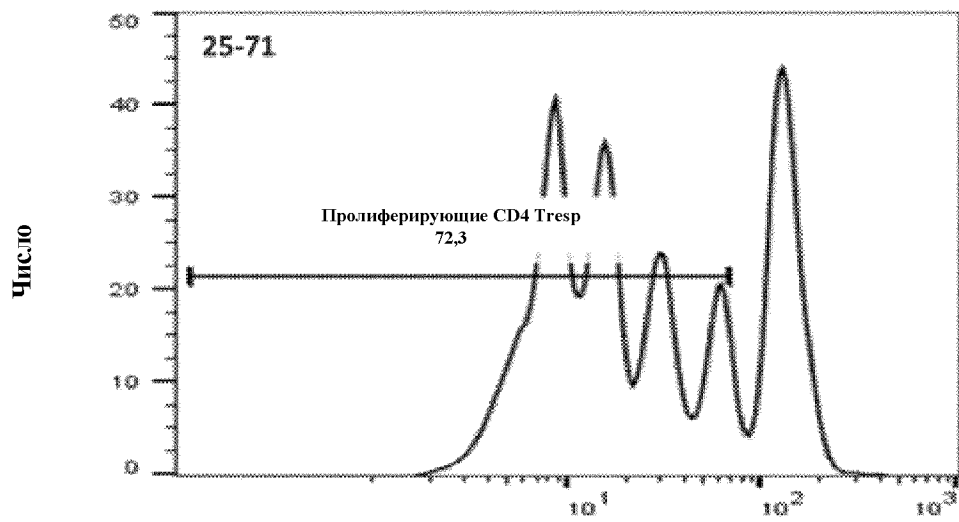
Подавление Т-клеток в процентах



ФИГ. 18С

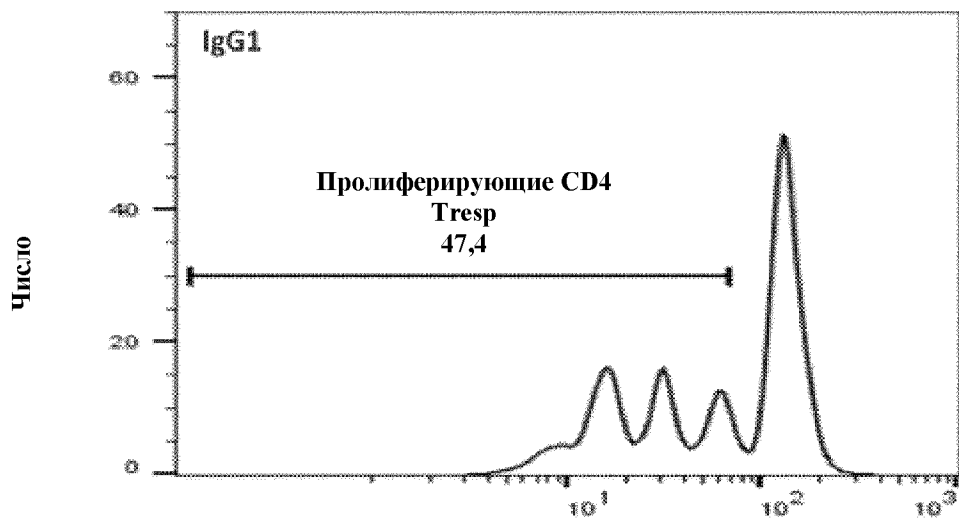
$T_{resp} : T_{reg} =$

1:2



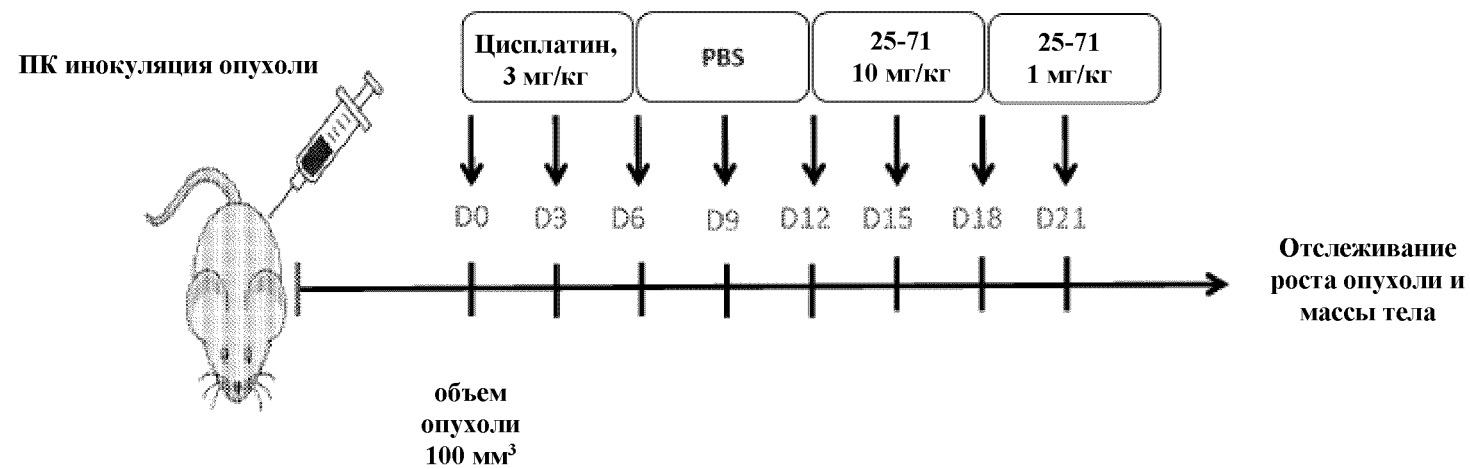
V1-A :: VioBlue-A

ФИГ. 18D

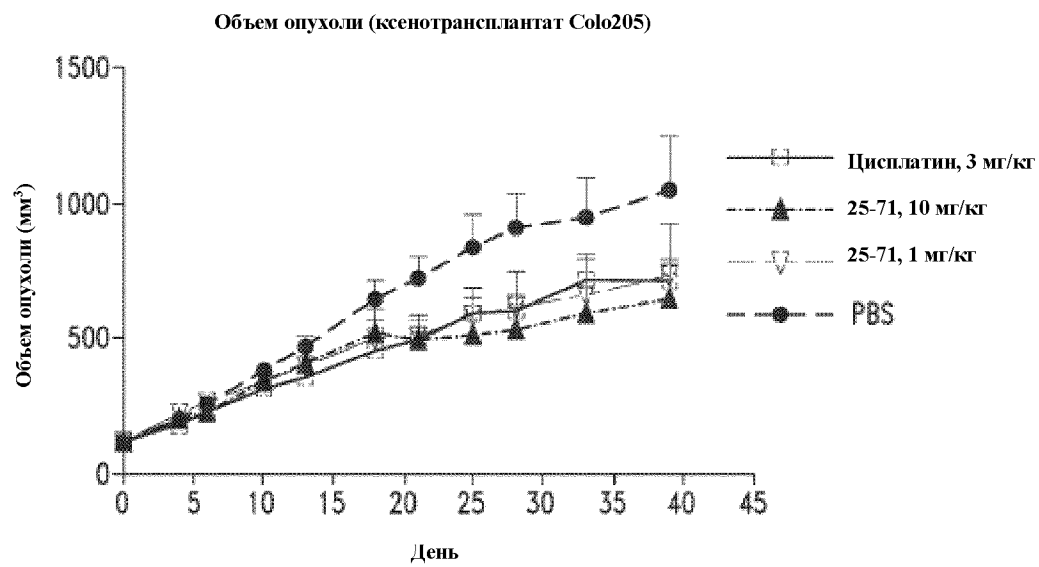


V1-A :: VioBlue-A

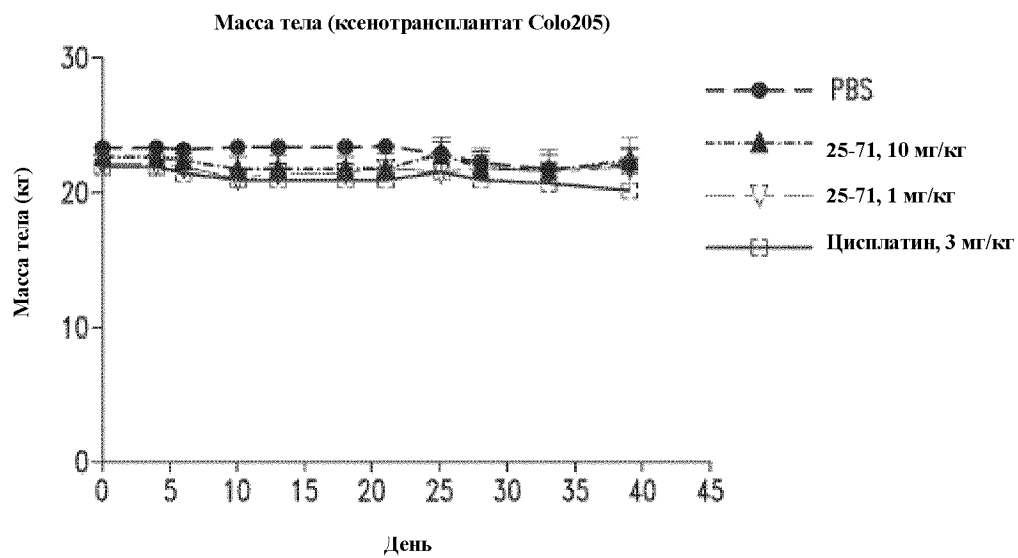
ФИГ. 18E



ФИГ. 19А



ФИГ. 19В



ФИГ. 19С