

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292131 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.24

(22) Дата подачи заявки
2021.02.04

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

(31) 62/970,046; 63/027,702; 63/110,633

(32) 2020.02.04; 2020.05.20; 2020.11.06

(33) US

(86) PCT/EP2021/052587

(87) WO 2021/156326 2021.08.12

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

(72) Изобретатель:

Сахин Угур, Муик Александр (DE),
Алтинтас Изил (NL), Форсманн Ульф
(DK), Сассер Кейт, Юре-Кункель
Мария, Гупта Маниш (US)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к способу уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли или лечения рака. Способ предусматривает введение субъекту связывающего средства, содержащего первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека. Количество связывающего средства, введенное в каждом цикле лечения, составляет, предпочтительно, около 0,3-5 мг/кг массы тела или около 25-400 мг суммарно.

A1

202292131

202292131

A1

АНТИТЕЛА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

Описание

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к способу уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли, или лечения рака посредством введения связывающего средства, содержащего первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

CD137 (4-1BB, TNFRSF9) является членом семейства рецепторов (TNFR) фактора некроза опухоли (TNF). CD137 является костимулирующей молекулой на CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетках, регуляторных Т-клетках (Трег), естественных киллерах (NK) и NKT-клетках, В-клетках и нейтрофилах. На Т-клетках, экспрессия CD137 не является конститутивной, но индуцируется при активации посредством Т-клеточного рецептора (TCR). Стимуляция посредством его природного лиганда 4-1BBL или агонистических антител приводит к передаче сигналов с использованием ассоциированного с TNFR фактора (TRAF)-2 и TRAF-1 в качестве адаптеров. Ранняя передача сигналов CD137 вовлекает реакции полиубиквитинилирования K-63, которые в конечном счете приводят к активации путей ядерного фактора (NF)-κB и активируемой митогенами протеинкиназы (MAP). Передача сигналов приводит к увеличенной костимуляции, пролиферации, продукции цитокинов, созреванию Т-клеток и продленной выживаемости CD8⁺ Т-клеток. Показано, что агонистические антитела против CD137 стимулируют противоопухолевый контроль посредством Т-клеток в различных доклинических моделях (Murillo et al. 2008 Clin. Cancer Res. 14(21): 6895-6906). Антитела, стимулирующие CD137, могут индуцировать выживаемость и пролиферацию Т-клеток, таким образом, усиливая противоопухолевый иммунный ответ. Антитела, стимулирующие CD137, раскрыты на предшествующем уровне техники и включают урелумаб, человеческое антитело IgG4 (WO2005035584) и утомилумаб, человеческое антитело IgG2 (Fisher et al. 2012 Cancer Immunol. Immunother. 61: 1721-1733).

Лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1) представляет собой однопроходный мембранный белок типа I размером 33 кДа. Описаны три изоформы PD-L1, основанные на альтернативном сплайсинге. PD-L1 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и содержит один Ig-подобный домен C2-типа и один Ig-подобный домен V-типа. Свежевыделенные Т- и В-клетки экспрессируют незначительные количества PD-L1, и фракция (приблизительно 16%) CD14⁺ моноцитов конститутивно экспрессирует PD-L1. Однако, известно, что интерферон-γ (IFNγ) осуществляет повышающую регуляцию PD-L1 на клетках опухолей.

PD-L1 препятствует противоопухолевому иммунитету посредством 1) придания толерантности реактивным по отношению к опухоли Т-клеткам посредством связывания с их рецептором, белком 1 программируемой клеточной смерти (PD-1) (CD279) на активированных Т-клетках; 2) придания клеткам опухолей устойчивости к CD8⁺ Т-клеткам и опосредованному лигандом Fas лизису посредством передачи сигналов PD-1 через экспрессированный клеткой опухоли PD-L1; 3) придание толерантности Т-клеткам посредством передачи обратных сигналов через экспрессированный Т-клеткой CD80 (B7.1); и 4) стимуляции развития и поддержания индуцированных регуляторных Т-клеток. PD-L1 экспрессируется во множестве раков человека, включая меланому, рак яичника, легкого и ободочной кишки (Latchman et al., 2004 Proc Natl Acad Sci USA 101, 10691-6).

Для блокирующих PD-L1 антител показана клиническая активность при нескольких раках, как известно, сверхэкспрессирующих PD-L1 (включая меланому, NSCLC). Например, атезолизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 против PD-L1. Он в настоящее время проходит клинические исследования в качестве иммунотерапии для нескольких показаний, включая различные типы солидных опухолей (см., например, Rittmeyer et al., 2017 Lancet 389:255-265), и является одобренным для показаний немелкоклеточного рака легкого и рака мочевого пузыря. Авелумаб, антитело против PD-L1, (Kaufman et al Lancet Oncol. 2016;17(10):1374-1385) одобрено FDA для лечения взрослых и педиатрических пациентов в возрасте 12 лет и старше с метастазирующей карциномой из клеток Меркеля, и в настоящее время проходит клинические исследования для нескольких показаний раков, включая рак мочевого пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, мезотелиому, NSCLC, рак яичника и рак почки. Дурвалумаб, антитело против PD-L1, является одобренным для показаний местнораспространенной или метастазирующей уротелиальной карциномы и находится в клинической разработке для множества солидных опухолей и раков клеток крови (см., например, Massard et al., 2016 J Clin Oncol. 34(26):3119-25). Дополнительные антитела против PD-L1 раскрыты например, в WO2004004771.

В Horton et al (J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): O10) раскрыта комбинация агонистического антитела против 4-1BB с нейтрализующим антителом против PD-L1. В WO 2019/025545 раскрыты связывающие средства, такие как биспецифические антитела, связывающие PD-L1 человека и связывающие CD137 человека.

Однако, несмотря на эти успехи в данной области, существует настоятельная необходимость в улучшенных видах терапии, нацеленных на PD-L1 и CD137.

Сущность настоящего изобретения

Целью настоящего изобретения является предоставление способа уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли, или лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту, по меньшей мере в одном цикле лечения, связывающего средства в подходящем количестве, содержащего первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения может составлять

- a) около 0,3-5 мг/кг массы тела или около 25-400 мг суммарно; и/или
- b) около $2,1 \times 10^{-9}$ - $3,4 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

Следующей целью настоящего изобретения является предоставление композиции, содержащей связывающее средство, содержащее первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека, причем количество связывающего средства в композиции составляет около 25-400 мг или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль.

Краткое описание фигур

Фигура 1: Одновременное связывание GEN1046 с экспрессирующими PD-L1- и CD137- клетками K562 индуцирует формирование дублета с колоколообразной кривой зависимости ответа от дозы. Равные количества меченных CellTrace™ дальнекрасным клеток K562, трансгенных по CD137 (K562_h4-1BB), совместно инкубировали с мечеными CellTrace™ фиолетовым клетками K562, трансгенными по PD-L1 (K562_hPD-L1), в присутствии 0,001-100 мкг/мл i) GEN1046 или ii) комбинации контрольных антител

против PD-L1-547-FEALxb12-FEAR и b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR в течение 15 минут. Образцы анализировали посредством проточной цитометрии, и процент двойных положительных по CellTrace™ дальнекрасному/CellTrace™ фиолетовому дублетов (A) наносили на график как функцию от концентрации GEN1046 (B). Показанные данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение для $n=3$ технических повторов (возможно, необходим меньший символ, чтобы показать SD).

Фигура 2: Схематическое представление предполагаемого механизма действия биспецифических антител CD137xPD-L1. (A) PD-L1 экспрессируется на антигенпредставляющих клетках (APC), так же как на клетках опухолей. PD-L1, связываясь с Т-клетками, экспрессирующими молекулу отрицательной регуляции PD-1, эффективно преодолевает сигналы активации Т-клеток и в конечном счете приводит к ингибированию Т-клеток. (B) При добавлении биспецифического антитела CD137xPD-L1, ингибирующее взаимодействие PD-1:PD-L1 блокируется посредством специфического для PD-L1-плеча и в то же самое время, биспецифическое антитело, посредством взаимодействия между клетками, обеспечивает агонистическую передачу сигналов к CD137, экспрессированному на Т-клетке, приводя к сильной стимуляции Т-клетки.

Фигура 3: Относительные единицы люминесценции (RLU) как функция от концентрации антитела в репортерном анализе на основе люциферазы активации посредством CD137, проводимом в присутствии экспрессирующих PD-L1 линий клеток опухолей. Эндогенно экспрессирующие PD-L1 линию клеток рака яичника человека ES-2 (A) и линию клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 (B) совместно культивировали с репортерными клетками NFkB-Luc2P/4-1BB Jurkat в присутствии 0,00128-100 мкг/мл i) GEN1046 или ii) контрольного антитела b12-FEAL в течение 6 часов. Индукцию экспрессии люциферазы определяли посредством инкубации с субстратом люциферазы и измерения относительных единиц люминесценции. Показанные данные представляют собой среднее \pm стандартное отклонение для $n=3$ технических повторов.

Фигура 4: Сравнение GEN1046 с контрольными антителами PD-L1-547-FEALxb12-FEAL или IgG1-b12-FEAL в анализе пролиферации поликлональных Т-клеток. Меченные CFSE PBMC инкубировали с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 (0,03 мкг/мл), и культивировали в присутствии 0,0032-10 мкг/мл i) GEN1046 ii) PD-L1-547-FEALxb12-FEAR или iii) контрольного антитела b12-FEAL в течение четырех суток. Пролиферацию Т-клеток для тотальных Т-клеток (A) и подгрупп CCR7+CD45RO+ Т-клеток центральной памяти и эффекторных CCR7-CD45RO+ Т-клеток памяти в тотальных Т-клетках (B) измеряли посредством проточной цитометрии. Показаны данные для одного репрезентативного донора как средний индекс размножения для двух повторов, как рассчитано с использованием программного обеспечения FlowJo v10.4. Планки погрешностей (SD) показывают изменчивость в пределах эксперимента (два повтора, с использованием клеток от одного донора).

Фигура 5: Освобождение от опосредованного PD-1/PD-L1 ингибирования Т-клеток и дополнительная стимуляция пролиферации CD8⁺ Т-клеток посредством GEN1046 в анализе антигенспецифических Т-клеток с активной осью PD-1/PD-L1. CD8⁺ Т-клетки подвергали электропорации с использованием РНК, кодирующей цепи альфа и бета специфического для CLDN6 TCR (10 мкг каждой), либо в присутствии РНК, кодирующей PD-1 (0,4-10 мкг), либо в ее отсутствие (без PD-1), подвергали мечению CFSE и совместно культивировали с незрелыми DC, которые подвергали электропорации с использованием 0,3 мкг (A) или 1 мкг (B) РНК, кодирующей CLDN6. Подвергнутые электропорации CD8⁺ Т-клетки и iDC совместно культивировали в присутствии GEN1046 (0,00015-1 мкг/мл) или b12-FEAL (1 мкг/мл) в течение 4 суток. Пролиферацию Т-клеток оценивали посредством анализа разведения CFSE в CD8⁺ Т-клетках с использованием проточной цитометрии, и индекс размножения Т-клеток (например, как

много из тотальной популяции Т-клеток подверглись размножению посредством пролиферации), автоматически рассчитывали посредством FlowJo (версии 10.3). Показанные данные представляют собой средний индекс размножения \pm SD для трех повторов лунок от одного донора из четырех доноров, включенных в два эксперимента.

Фигура 6: Эффект GEN1046 на секрецию провоспалительных цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-13 и IL-8) в анализе антигенспецифических Т-клеток в присутствии или в отсутствие электропорации PD-1 в Т-клетки. CD8⁺ Т-клетки подвергали электропорации с использованием РНК, кодирующей цепи альфа и бета специфического для CLDN6 TCR (10 мкг каждой), либо в присутствии РНК, кодирующей PD-1 (2 мкг), либо в ее отсутствие (без PD-1), подвергали мечению CFSE и совместно культивировали с незрелыми DC, которые подвергали электропорации с использованием 1 мкг РНК, кодирующей CLDN6. Подвергнутые электропорации CD8⁺ Т-клетки и iDC совместно культивировали в присутствии GEN1046 (0,00015-1 мкг/мл) или b12-FEAL (1 мкг/мл). Уровни цитокинов супернатантов определяли через 48 часов после добавления антитела посредством мультиплексного сэндвич-иммуноанализа с использованием 10-плексного набора для анализа провоспалительной панели 1 человека MSD V-Plex Human (10-Plex). Показанные данные представляют собой среднюю концентрацию \pm SD для шести повторов лунок для одного репрезентативного донора из двух доноров, включенных в эксперимент.

Фигура 7: Размножение *ex vivo* инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) после резекции ткани немелкоклеточного рака легкого человека, посредством CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR. Фрагменты опухоли из резецированной ткани культивировали с 10 ед./мл IL-2 и указанной концентрацией CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR. Через 10 суток культивирования, клетки собирали и анализировали посредством проточной цитометрии. (A) количество TIL на 1000 бусин, (B) количество CD3+CD8⁺ Т-клеток на 1000 бусин, (C) количество CD3+CD4⁺ Т-клеток на 1000 бусин, (D) количество CD3-CD56⁺ NK-клеток на 1000 бусин. Показанные данные представляют собой средние количества клеток \pm SD для пяти индивидуальных лунок, с двумя фрагментами опухоли на лунку в качестве исходного материала. * $p < 0,05$ с использованием обычного однофакторного ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта.

Фигура 8: Схематическое изображение дизайна клинических исследований.

Фигура 9: Повышение дозы; наилучший процент изменения от исходного размера опухоли, все пациенты. Прекращение сбора данных: 29 сентября 2020 г. Сканирования после исходного осмотра не проводили для пяти пациентов. ^aМинимальная длительность ответа (5 недель) по RECIST v1.1 не достигнута. ^bPR не подтвержден при последующем сканировании.

NE, не поддается оценке; NSCLC, немелкоклеточный рак легкого; PD, прогрессирующее заболевание; PD-(L)1, (лиганд) программируемой смерти 1; PR, частичный ответ; SD, стабильное заболевание; SoD, сумма диаметров; uPR, неподтвержденный частичный ответ.

Фигура 10: Повышение дозы; наилучшее изменение от исходного размера опухоли, пациенты с NSCLC. Прекращение сбора данных: 29 сентября 2020 г.

^aPR не подтвержден при последующем сканировании.

^b Экспрессию PD-L1 оценивали в архивных образцах опухолей.

BOR, наилучший общий ответ; CR, полный ответ; ICI, ингибитор иммунной контрольной точки; NA, недоступно; PD, прогрессирующее заболевание; PD-(L)1, (лиганд) программируемой смерти 1; PR, частичный ответ; RECIST, критерии оценки ответа при солидных опухолях; SD, стабильное заболевание; SoD, сумма диаметров; TPS, показатель доли опухоли; uPR, неподтвержденный частичный ответ.

Фигура 11: Когорта расширения 1; А) Наилучшее изменение от исходного размера опухоли, В) изменение от исходного SoD целевого очага. Прекращение сбора данных: 12 октября 2020 г.

*Обозначает пациентов с текущим лечением.

^aPR не подтвержден при последующем сканировании. ^bЭкспрессию PD-L1 оценивали в биоптатах опухоли, полученных до начала лечения GEN1046 (анализ 22C3 pharmDx, HistoGeneX, Belgium). Включает всех пациентов, которые имели по меньшей мере одну оценку опухоли после исходной (по расписанию, каждые 6 недель), и таким образом, могли быть оценены по клиническому преимуществу; 6 из 12 пациентов все еще подвергаются лечению. Из оставшихся не показанных 12 пациентов, три пациента имели клиническое прогрессирование до первой оценки ответа, и девять пациентов все еще подвергаются лечению, и они не имели первой оценки ответа.

BOR и ответ во временной точке, оцененные с использованием RECIST 1.1; NA: оценка после первого PD. BOR, наилучший общий ответ; ICI, ингибитор иммунной контрольной точки; NA, недоступно; NE, не поддается оценке; NSCLC, немелкоклеточный рак легкого; PD, прогрессирующее заболевание; PD-(L)1, (лиганд) программируемой смерти 1; PR, частичный ответ; RECIST, критерии оценки ответа при солидных опухолях; SD, стабильное заболевание; SoD, сумма диаметров; TPS, показатель доли опухоли; uPR, неподтвержденный частичный ответ.

Фигура 12: Прогнозируемые согласно модели максимальное формирование тримеров и занятость рецептора для PD-L1 при дозе 100 мг, вводимой один раз каждую третью неделю (1Q3W).

Фигура 13: А-Д Фармакодинамические оценки, включая изменения уровней циркулирующих интерферона-гамма (IFN- γ) и индуцируемого интерфероном-гамма-белка 10 IP-10 (А-В), пролиферирующих эффекторных CD8 Т-клеток памяти и тотальных CD8 Т-клеток (С-Д), проводили с использованием образцов крови от пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях, зарегистрированных в фазу повышения дозы открытого, многоцентрового исследования безопасности GEN1046 (NCT03917381; Прекращение сбора данных: 19^е января 2021 г.).

А-В. Уровни циркулирующих IFN- γ и IP-10 измеряли в образцах сыворотки в исходной точке и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (сутки 1 [2 час и между 4 и 6 час после введения], 2, 3, 8 и 15). Уровни IFN- γ и IP-10 в образцах сыворотки определяли посредством мультиплексного иммунного анализа Meso Scale Discovery (MSD). Показанные данные представляют собой максимальную кратность изменения от исходного, измеренную в ходе цикла 1. Статистический анализ проводили с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

С-Д. Иммунофенотипирование периферической крови проводили в цельной крови, собранной в исходной точке и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (сутки 2, 3, 8 и 15). Частоту пролиферирующих (Ki67⁺) тотальных CD8 Т-клеток и эффекторных CD8 Т-клеток памяти (CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁻ Т-клеток) оценивали в образцах цельной крови посредством проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой максимальную кратность изменения от исходного, измеренную в ходе цикла 1. Статистический анализ проводили с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

Термин «связывающее средство», в контексте настоящего изобретения, относится к любому средству, способному к связыванию желательных антигенов. Согласно конкретным вариантам

осуществления изобретения, связывающее средство представляет собой антитело, фрагмент антитела или его конструкцию. Связывающее средство может также содержать синтетические, модифицированные или неприродные группы, в частности, непептидные группы. Такие группы могут, например, связывать желательные антигенсвязывающие функциональные группы или области, такие как антитела или фрагменты антител. Согласно одному варианту осуществления, связывающее средство представляет собой синтетическую конструкцию, содержащую антигенсвязывающие CDR или переменные области.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких (L) цепей с низкой молекулярной массой, и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре соединены друг с другом дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Кратко, каждая тяжелая цепь, как правило, состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_H или VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как C_H или CH). Константная область тяжелой цепи, как правило, состоит из трех доменов, $CH1$, $CH2$ и $CH3$. Шарнирная область представляет собой область между доменами $CH1$ и $CH2$ тяжелой цепи и является очень гибкой. Дисульфидные связи в шарнирной области составляют часть взаимодействий между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь, как правило, состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L или VL) и константной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как C_L или CL). Константная область легкой цепи как правило, состоит из одного домена, CL . Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут являться гипервариабельными по последовательности и/или формировать структурно определенные петли), также названные определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, названными каркасными областями (FR). Каждая VH и VL , как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, аранжированных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Если не указано иное или не противоречит контексту, последовательности CDR в настоящем документе идентифицированы в соответствии с правилами IMGT с использованием DomainGapAlign (Lefranc MP., *Nucleic Acids Research* 1999;27:209-212 и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. *Nucleic Acids Res.*, 38, D301-307 (2010); см. также адрес [http](http://www.imgt.org/) в интернет www.imgt.org/). Если не указано иное или не противоречит контексту, ссылка на положения аминокислот в константных областях по настоящему изобретению приведена в соответствии с нумерацией EU (Edelman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). Например, в SEQ ID NO:93 в настоящем документе указаны положения аминокислот 118-447 в соответствии с нумерацией EU, константной области тяжелой цепи IgG1m(f).

Термин «аминокислота» и «аминокислотный остаток» могут быть использованы в настоящем документе взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты представляют собой органические соединения, содержащие амино- ($-NH_2$) и карбоксильную ($-COOH$) функциональные группы, вместе с боковой цепью (R-группой), специфической для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения, аминокислоты можно классифицировать на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или в обеих из следующих таблиц:

Таблица 1: Основная классификация на основе структуры и общей химической характеристики R-группы

Класс	Аминокислота
Кислые остатки	D и E
Основные остатки	K, R и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Таблица 2: Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Класс	Аминокислота
Содержащие гидроксильную группу остатки	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Ассоциированные с циклоалкенилом остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, вовлеченные в формирование поворота	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Замену одной аминокислоты на другую можно классифицировать как консервативную или неконсервативную замену. В контексте настоящего изобретения, «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую сходные структурные и/или химические характеристики, такую замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток, как определено в любой из двух таблиц выше: например, лейцин можно заменять на изолейцин, поскольку они оба являются алифатическими, разветвленными, гидрофобными. Подобным образом, аспарагиновую кислоту можно заменять на глутаминовую кислоту, поскольку они обе представляют собой маленькие, отрицательно заряженные остатки.

Термин «аминокислота, соответствующая положению...», в рамках изобретения, относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти посредством выравнивания с IgG1 человека. Таким образом, аминокислота или фрагмент в одной последовательности, которые «соответствуют» аминокислоте или фрагменту в другой последовательности, представляют собой те, которые выровнены с другими аминокислотой или фрагментом с использованием стандартной программы для выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичная, как правило, при установках по умолчанию, и имеют по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей

мере 95% идентичность с тяжелой цепью IgG1 человека. Считают хорошо известным в данной области, каким образом выравнивать последовательность или фрагмент в последовательности, и таким образом, определять в последовательности положение, соответствующее положению аминокислоты в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «антитело» (Ab), в контексте настоящего изобретения, относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые имеют способность специфического связывания с антигеном в типичных физиологических условиях со временем полужизни из числа значительных периодов времени, таких как по меньшей мере около 30 минут, по меньшей мере около 45 минут, по меньшей мере около одного часа, по меньшей мере около двух часов, по меньшей мере около четырех часов, по меньшей мере около 8 часов, по меньшей мере около 12 часов, около 24 часа или более, около 48 часов или более, около 3, 4, 5, 6, 7 или более суток и т.д., или любой другой определенный соответствующей функциональностью период (такой как время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного с антителом, связывающим антиген, и/или время, достаточное для привлечения эффекторной активности антитела). Варибельные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Термин «антигенсвязывающая область», в рамках изобретения, относится к области, который взаимодействует с антигеном и содержит как область VH, так и область VL. Термин антитело, в рамках изобретения, включает не только моносpezifические антитела, но также мультисpezifические антитела, содержащие множество, такое как две или более, например, три или более, различных антигенсвязывающих областей. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента. Как указано выше, термин антитело в настоящем документе, если не указано иное или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые представляют собой антигенсвязывающие фрагменты, т.е., сохраняют способность специфического связывания с антигеном. Показано, что функцию связывания антигена антителом можно осуществлять посредством фрагментов полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охваченных термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, как раскрыто в WO2007059782 (Genmab); (ii) фрагменты F(ab')₂, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанные посредством дисульфидного мостика в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)), состоящий по существу из домена VH и также называемый доменными антителами (Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov; 21(11):484-90); (vi) молекулы антител верблюдовых или наноантител (Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan; 5(1):111-24) и (vii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодированы отдельными генами, их можно соединять, с использованием рекомбинантных способов, посредством синтетического линкера, который позволяет их получение в форме одиночной белковой цепи, в которой области VL и VH образуют пару для формирования одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv), см., например, Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988) и Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело, если иное не отмечено или явно не указано посредством контекста. Хотя

такие фрагменты в общем включены в значение антитела, они совместно и каждый независимо являются уникальными признаками настоящего изобретения, имея различные биологические свойства и полезность. Эти и другие применимые фрагменты антител, в контексте настоящего изобретения, так же как биспецифические форматы таких фрагментов, обсуждают далее в настоящем документе. Следует понимать также, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность специфического связывания с антигеном (антигенсвязывающ фрагменты), полученные посредством любого известного способа, такого как ферментное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные способы. Антитело, как получено, может иметь любой изотип. В рамках изобретения, термин «изотип» относится к классу иммуноглобулина, (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодирован генами константной области тяжелой цепи. Когда конкретный изотип, например, IgG1, упомянут в настоящем документе, термин не является ограниченным последовательностью специфического изотипа, например, последовательностью конкретного IgG1, но использован для того, чтобы показать, что антитело является более близким по последовательности к этому изотипу, например, IgG1, чем к другому изотипу. Таким образом, например, антитело IgG1 по изобретению может представлять собой вариант последовательности природного антитела IgG1, включая варианты константных областей.

Термин «биспецифическое антитело» или «bs», в контексте настоящего изобретения, относится к антителу, имеющему две различные антигенсвязывающие области, определенные различными последовательностями антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления, указанные различные антигенсвязывающие области связывают различные эпитопы на одном и том же антигене. Однако, в предпочтительных вариантах осуществления, указанные различные антигенсвязывающие области связывают различные антигены-мишени. Биспецифическое антитело может иметь любой формат, включая любой из форматов биспецифического антитела, раскрытых в настоящем документе ниже.

Термин «полноразмерный», при применении в контексте антитела указывает, что антитело не является фрагментом, но содержит все из доменов конкретного изотипа, в норме обнаруживаемые для этого изотипа в природе, например, домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнира, VL и CL для антитела IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления, термин «полноразмерный» в рамках изобретения в контексте антитела, относится к антителу (например, исходному антителу или варианту антитела), содержащему одну или две пары тяжелых и легких цепей, причем каждая содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи, в норме обнаруживаемые в паре тяжелая цепь-легкая цепь из антитела дикого типа этого изотипа. В полноразмерном антителе, константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи могут содержать аминокислотные замены, которые улучшают функциональные свойства антитела, по сравнению с полноразмерным исходным антителом или антителом дикого типа. Они включают замены с целью уменьшения эффекторной функции антитела и замены для облегчения сборки мультиспецифических антител, таких как биспецифические антитела. Полноразмерное антитело в соответствии с настоящим изобретением можно получать способом, предусматривающим стадии (i) клонирования последовательностей CDR в подходящий вектор, содержащий полные последовательности тяжелой цепи и полную последовательность легкой цепи, и (ii) экспрессии полных последовательностей тяжелой и легкой цепей в подходящих системах экспрессии. В рамках компетенции специалиста в данной области является получение полноразмерного антитела, начиная либо с последовательностей CDR, либо с полных последовательностей переменной области.

Термин «человеческое антитело», в рамках изобретения, предназначен для включения антител, имеющих переменные и каркасные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов, и константный домен человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вставки или делеции, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако, термин «человеческое антитело», в рамках изобретения, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого не относящегося к человеку вида, такого как мышь, привиты в человеческие каркасные последовательности.

Термин «гуманизированное антитело», в рамках изобретения, относится к полученному посредством генетической инженерии не относящемуся к человеческому антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и не относящиеся к человеку переменные домены, модифицированные для содержания высокого уровня гомологии последовательности с человеческими переменными доменами. Этого можно достигать посредством прививки шести не относящихся к человеческому антителу определяющих комплементарность областей (CDR), которые совместно формируют антигенсвязывающий участок, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Для полной реконструкции аффинности связывания и специфичности исходного антитела, может являться необходимой введение замен каркасных остатков из исходного антитела (т.е. не относящегося к человеку антитела) в человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые являются важными для свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать не относящиеся к человеку последовательности CDR, преимущественно, человеческие каркасные области, необязательно, содержащие одну или более обратных мутаций аминокислот до не относящейся к человеку аминокислотной последовательности, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные модификации аминокислот, которые не обязательно представляют собой обратные мутации, можно использовать для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

В рамках изобретения, если это не противоречит контексту, термин «область Fc» относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, в котором указанные последовательности Fc содержат по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3.

Термин «область Fc» в рамках изобретения, относится к области, содержащей, в направлении от N- до C-конца антитела, по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и область CH3. Область Fc антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

Термин «шарнирная область», в рамках изобретения, относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, шарнирная область антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 216-230, в соответствии с нумерацией Eu, как указано в Kabat (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662680689 (1991)). Однако, шарнирная область может также принадлежать к любому из других подтипов, как раскрыто в настоящем документе.

Термин «область СН1» или «домен СН1», в рамках изобретения, относится к области СН1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область СН1 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 118-215, в соответствии с нумерацией E_u, как указано в Kabat (там же). Однако, область СН1 может также принадлежать к любому из других подтипов, как раскрыто в настоящем документе.

Термин «область СН2» или «домен СН2», в рамках изобретения, относится к области СН2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область СН2 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340, в соответствии с нумерацией E_u, как указано в Kabat (там же). Однако, область СН2 может также принадлежать к любому из других подтипов как раскрыто в настоящем документе.

Термин «область СН3» или «домен СН3», в рамках изобретения, относится к области СН3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область СН3 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447, в соответствии с нумерацией E_u, как указано в Kabat (там же). Однако, область СН3 может также принадлежать к любому из других подтипов, как раскрыто в настоящем документе.

В рамках изобретения, термины «связывающий» или «способный к связыванию», в контексте связывания антитела с predetermined антигеном или эпитопом, как правило, представляют собой связывание с аффинностью, соответствующей K_D около 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} М или менее, или около 10^{-11} М или даже менее, при определении с использованием интерферометрии биослоя (BLI) или, например, при определении с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в устройстве VIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита. Антитело связывается с predetermined антигеном с аффинностью, соответствующей K_D которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его K_D для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от predetermined антигена или близко родственного антигена. Уровень, на который аффинность выше, зависит от K_D антитела, так что когда K_D антитела является очень низкой (то есть, антитело является высоко специфическим), тогда степень, до которой аффинность для антигена ниже, чем аффинность для неспецифического антигена, может составлять по меньшей мере 10000 раз.

Термин « k_d » (s^{-1}), в рамках изобретения, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также обозначено как значение k_{off} .

Термин « K_D » (М), в рамках изобретения, относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин «PD-L1», в рамках изобретения, относится к белку лиганду 1 программируемой смерти. PD-L1 обнаружен у человека и других видов, и таким образом, термин «PD-L1» не является ограниченным PD-L1 человека, если это не противоречит контексту. Последовательности PD-L1 человека можно обнаружить под no. доступа в Genbank NP_054862.1. Последовательность PD-L1 человека также показана в SEQ ID NO: 25, в которой аминокислоты 1-18, как прогнозировано, представляют собой сигнальный пептид. Зрелая полипептидная последовательность представлена в SEQ ID NO: 26.

Термин «PD-1», в рамках изобретения, относится к белку 1 программируемой смерти человека, также известному как CD279 (UniProtKB Q15116).

Термин «путь 1 программируемой клеточной смерти (PD-1)» или «путь PD-1» относится к молекулярному пути передачи сигналов, включающему рецептор поверхности клетки PD-1 и его лиганды

PD-L1 и PD-L2. Активация этого пути индуцирует иммунную толерантность, тогда как ингибирование освобождает Т-клетки от супрессии, что может приводить к иммунной активации.

Термин «CD137», в рамках изобретения, относится к белку 137 кластера дифференцировки человека. CD137 (4-1BB), также обозначенный как TNFRSF9, представляет собой рецептор для лиганда TNFSF9/4-1BBL. Считают, что CD137 вовлечен в активацию Т-клеток. CD137 человека имеет номер доступа в UniProt Q07011. Последовательность CD137 человека также показана в SEQ ID NO: 23, в которой аминокислоты 1-23, как прогнозировано, представляют собой сигнальный пептид. Зрелая последовательность CD137 человека представлена в SEQ ID NO: 24.

«Цикл лечения» определен в настоящем документе как период времени, в рамках которого эффекты отдельных доз связывающего средства суммируются из-за его фармакодинамики, или иными словами, период времени, после которого организм субъекта по существу завершает клиренс или подвергается клиренсу введенного связывающего средства. Множество малых доз в малом временном окне; например, в пределах небольшого количества 2-24 часов, например, 2-12 часов или в одни и те же сутки, может являться равным большей однократной дозе.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений, разделяемых последовательностями (т.е., % гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений x 100), принимая во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, можно, например, определять с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), встроенного в программу ALIGN программа (версии 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за делецию 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

В контексте настоящего изобретения, следующие условные обозначения, если не указано иное, использованы для описания мутации: i) замена аминокислоты в данном положении записана, например, как K409R, что означает замену лизина в положении 409 белка на аргинин; и ii) для конкретных вариантов использованы конкретные трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначена как: K409R, и замена лизина на любой аминокислотный остаток в положении 409 обозначена как K409X. В случае делеции лизина в положении 409, она обозначена как K409*.

В контексте настоящего изобретения, «ингибирование связывания PD-L1 с PD-1» относится к любому детектируемо значимому уменьшению связывания PD-L1 с PD-1 в присутствии антитела, способного к связыванию PD-L1. Как правило, ингибирование означает уменьшение по меньшей мере около на 10%, например, по меньшей мере около на 15%, например, по меньшей мере около на 20%, например, уменьшение по меньшей мере около на 40% связывания между PD-L1 и PD-1, вызванное присутствием антитела против PD-L1. Ингибирование связывания PD-L1 с PD-1 можно определять посредством любого пригодного способа. Согласно одному варианту осуществления, ингибирование определяют, как раскрыто в примере 6 из WO 2019/025545.

Термин «лечение» относится к введению эффективного количества терапевтически активного антитела по настоящему изобретению с целью облегчения, смягчения, ареста или уничтожения (излечения) симптомов или состояний заболевания.

Устойчивость к лечению, неудачу ответа на лечения и/или рецидив после лечения с использованием связывающего средства по изобретению можно определять, в соответствии с Критериями оценки ответа при солидных опухолях; версии 1.1 (Критерии RECIST v1.1). Критерии RECIST указаны в таблице ниже.

Таблица 3: Определение ответа (Критерии RECIST v1.1)

	Категория	Критерии
На основании целевых очагов	Полный ответ (CR)	Исчезновение всех целевых очагов. Любые патологические лимфатические узлы должны иметь уменьшение по короткой оси до < 10 мм.
	Частичный ответ (PR)	≥ 30% уменьшение суммы LD целевых очагов, принимая за эталон исходную сумму LD.
	Стабильное заболевание (SD)	Отсутствие как значительного уменьшения для квалификации PR, так и значительного увеличения для квалификации PD, принимая за эталон наименьшую сумму LD после начала лечения.
	Прогрессирующее заболевание (PD)	≥ 20% увеличение суммы LD целевых очагов, принимая за эталон наименьшую сумму LD, зарегистрированную после начала лечения, или появление одного или более новых очагов.
На основании нецелевых очагов	CR	Исчезновение всех нецелевых очагов и нормализация уровня маркера опухоли. Все лимфатические узлы должны иметь непатологический размер (короткая ось < 10 мм).
	SD	Персистенция одного или более нецелевых очага(ов) и/или сохранение уровня маркера опухоли выше нормальных пределов.
	PD	Появление одного или более новых очагов и/или очевидное прогрессирование существующих нецелевых очагов.

«Наилучший общий ответ» представляет собой наилучший ответ, зарегистрированный от начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные от начала лечения, можно использовать в качестве эталона для PD). Субъектов с CR или PR рассматривают как имеющих объективный ответ. Субъектов с CR, PR или SD рассматривают как имеющих контроль заболевания. Субъектов с NE подсчитывают как неотвечающих. Наилучший общий ответ представляет собой наилучший ответ, зарегистрированный от начала лечения до прогрессирования/рецидива заболевания (наименьшие измерения, зарегистрированные от начала лечения, можно использовать в качестве эталона для PD). Субъектов с CR, PR или SD рассматривают как имеющих контроль заболевания. Субъектов с NE подсчитывают как неотвечающих.

«Длительность ответа (DOR)» применяют только для субъектов, подтвержденным наилучшим общим ответом которых является CR или PR, и определяют как время от первого документированного объективного ответа опухоли (CR или PR) до даты первого PD или смерти из-за лежащей в основе рака.

«Выживаемость без прогрессирования (PFS)» определяют как количество суток от суток 1 в цикле 1 до первого документированного прогрессирования или смерти по любой причине.

«Общую выживаемость (OS)» определяют как количество суток от суток 1 в цикле 1 до смерти по любой причине. Если неизвестно о смерти субъекта, тогда OS цензурят по наиболее поздней дате, когда известно, что субъект был жив (на время или до даты прекращения сбора данных).

В контексте настоящего изобретения, термин «режим лечения» относится к структурированному плану лечения, разработанному для улучшения и поддержания здоровья.

Согласно первому аспекту, настоящее изобретение относится к способу уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли, или лечения рака у субъекта, включающему введение указанному субъекту, по меньшей мере в одном цикле лечения, связывающего средства в подходящем количестве, содержащего первую область связывания, связывающую CD137 человека, такой как CD137 человека, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека, такой как PD-L1 человека, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26.

Предпочтительно, количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или цикле лечения, приводит к пролиферации, продукции цитокинов, созреванию и продленной выживаемости Т-клеток, и делает такие Т-клетки нечувствительными к ингибированию посредством PD-L1.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или цикле лечения, может, в частности, лежать в диапазоне, в котором более чем 5%, предпочтительно, более чем 10%, более предпочтительно, более чем 15%, даже более предпочтительно, более чем 20%, даже более предпочтительно, более чем 25%, даже более предпочтительно, более чем 30%, даже более предпочтительно, более чем 35%, даже более предпочтительно, более чем 40%, даже более предпочтительно, более чем 45%, наиболее предпочтительно, более чем 50% указанных связывающих средств связываются с обоими, CD137 и PD-L1.

Согласно предпочтительным в настоящее время вариантам осуществления, количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

- а) около 0,3-5 мг/кг массы тела или около 25-400 мг суммарно; и/или
- б) около $2,1 \times 10^{-9}$ - $3,4 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

Согласно этим вариантам осуществления, дозу, определенную в мг/кг, можно конвертировать в постоянную дозу, и наоборот, на основании медианной массы тела субъектов, которым вводят связывающее средство, составляющей 80 кг

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может, в частности, составлять

- около 0,3-4,0 мг/кг массы тела или около 25-320 мг суммарно; и/или
- около $2,1 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
- около 0,38-4,0 мг/кг массы тела или около 30-320 мг суммарно; и/или
- около $2,6 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
- около 0,5-3,3 мг/кг массы тела или около 40-260 мг суммарно; и/или
- около $3,4 \times 10^{-9}$ - $2,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
- около 0,6-2,5 мг/кг массы тела или около 50-200 мг суммарно; и/или
- около $4,3 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
- около 0,8-1,8 мг/кг массы тела или около 60-140 мг суммарно; и/или
- около $5,1 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
- около 0,9-1,8 мг/кг массы тела или около 70-140 мг суммарно; и/или

около $6,0 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 около 1-1,5 мг/кг массы тела или около 80-120 мг суммарно; и/или
 около $6,8 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 около 1,1-1,4 мг/кг массы тела или около 90-110 мг суммарно; и/или
 около $7,7 \times 10^{-9}$ - $9,4 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 около 1,2-1,3 мг/кг массы тела или около 95-105 мг суммарно; и/или
 около $6,8 \times 10^{-9}$ - $8,9 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно,
 около 0,8-1,5 мг/кг массы тела или около 65-120 мг суммарно; и/или
 около $5,5 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 около 0,9-1,3 мг/кг массы тела или около 70-100 мг суммарно; и/или
 около $6,0 \times 10^{-9}$ - $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно,
 около 0,9-1,1 мг/кг массы тела или около 75-90 мг суммарно; и/или
 около $6,4 \times 10^{-9}$ - $7,7 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Кроме того, количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может, в частности, составлять

0,3-4,0 мг/кг массы тела или 25-320 мг суммарно; и/или
 $2,1 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
 0,38-4,0 мг/кг массы тела или 30-320 мг суммарно; и/или
 $2,6 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
 0,5-3,3 мг/кг массы тела или 40-260 мг суммарно; и/или
 $3,4 \times 10^{-9}$ - $2,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
 0,6-2,5 мг/кг массы тела или 50-200 мг суммарно; и/или
 $4,3 \times 10^{-9}$ - $1,7 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль суммарно;
 0,8-1,8 мг/кг массы тела или 60-140 мг суммарно; и/или
 $5,1 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 0,9-1,8 мг/кг массы тела или 70-140 мг суммарно; и/или
 $6,0 \times 10^{-9}$ - $1,2 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 1-1,5 мг/кг массы тела или 80-120 мг суммарно; и/или
 $6,8 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 1,1-1,4 мг/кг массы тела или 90-110 мг суммарно; и/или
 $7,7 \times 10^{-9}$ - $9,4 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 1,2-1,3 мг/кг массы тела или 95-105 мг суммарно; и/или
 $6,8 \times 10^{-9}$ - $8,9 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно,
 0,8-1,5 мг/кг массы тела или 65-120 мг суммарно; и/или
 $5,5 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль суммарно;
 0,9-1,3 мг/кг массы тела или 70-100 мг суммарно; и/или
 $6,0 \times 10^{-9}$ - $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно,
 0,9-1,1 мг/кг массы тела или 75-90 мг суммарно; и/или
 $6,4 \times 10^{-9}$ - $7,7 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

а) около 1,1 мг/кг массы тела или около 80 мг суммарно; и/или

b) около $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $5,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

a) 1,1 мг/кг массы тела или 80 мг суммарно; и/или

b) $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $5,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

a) около 1,0 мг/кг массы тела или около 80 мг суммарно; и/или

b) около $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $5,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

a) 1,0 мг/кг массы тела или 80 мг суммарно; и/или

b) $6,8 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $5,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

В настоящее время предпочтительно, чтобы количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляло

a) около 1,25 мг/кг массы тела или около 100 мг суммарно; и/или

b) около $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

В равной степени предпочтительно, чтобы количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляло

a) 1,25 мг/кг массы тела или 100 мг суммарно; и/или

b) $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Связывающее средство может представлять собой средство, которое активирует CD137 человека при связывании с ним, и ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека при связывании с PD-L1.

В способе по настоящему изобретению, связывающее средство может представлять собой средство, в котором

a) первая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 1, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 5;

и

b) вторая антигенсвязывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 8, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 12.

В способе по настоящему изобретению, связывающее средство может представлять собой средство, в котором

a) первая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в: SEQ ID NO: 2, 3 и 4, соответственно, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в: SEQ ID NO: 6, GAS, 7, соответственно;

и

b) вторая антигенсвязывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в: SEQ ID NO: 9, 10, 11, соответственно, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в: SEQ ID NO: 13, DDN, 14, соответственно.

Кроме того, в способе по настоящему изобретению, связывающее средство может представлять собой средство, в котором

a) Первая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5;

и

b) вторая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В способе по настоящему изобретению, связывающее средство представляет собой средство, в котором

a) Первая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5;

и

b) вторая связывающая область содержит, состоит из или по существу состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, и варибельной области легкой цепи (VL), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12.

Связывающее средство может, в частности, представлять собой антитело, такое как мультиспецифическое антитело, или такое как биспецифическое антитело.

Также, связывающее средство может иметь формат полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Является более предпочтительным, чтобы антитело представляло собой человеческое антитело или гуманизированное антитело

Каждая варибельная область может содержать три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Определяющие комплементарность области и каркасные области могут быть аранжированы от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Связывающее средство может содержать

i) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной варибельной области первой тяжелой цепи (VH) и константной области первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной варибельной области второй тяжелой цепи (VH) и константной области второй тяжелой цепи (CH).

В способе по настоящему изобретению, связывающее средство может содержать, состоять из или по существу состоять из

i) полипептида, содержащего указанную варибельную область первой легкой цепи (VL) и дополнительно содержащего константную область первой легкой цепи (CL), и

ii) полипептида, содержащего указанную варибельную область второй легкой цепи (VL) и дополнительно содержащего константную область второй легкой цепи (CL).

Связывающее средство может представлять собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, в котором первое связывающее плечо содержит, состоит из или по существу состоит из

i) полипептида, содержащего указанную варибельную область первой тяжелой цепи (VH) и указанную константную область первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептида, содержащего указанную варибельную область первой легкой цепи (VL) и указанную константную область первой легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит, состоит из или по существу состоит из

iii) полипептида, содержащего указанную варибельную область второй тяжелой цепи (VH) и указанную константную область второй тяжелой цепи (CH), и

iv) полипептида, содержащего указанную варибельную область второй легкой цепи (VL) и указанную константную область второй легкой цепи (CL).

Связывающее средство может содержать, состоять из или по существу состоять из

i) первой тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с CD137, и

ii) второй тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с PD-L1.

Связывающее средство может содержать, состоять из или по существу состоять из

i) первой тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с CD137, причем первая тяжелая цепь содержит константную область первой тяжелой цепи, и первая легкая цепь содержит константную область первой легкой цепи; и

ii) второй тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с PD-L1, причем вторая тяжелая цепь содержит константную область второй тяжелой цепи, и вторая легкая цепь содержит константную область второй легкой цепи.

Константные области (CH) каждой из первой и второй тяжелой цепи могут содержать одну или более из константной области 1 тяжелой цепи (CH1), шарнирной области, константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой цепи (CH3), предпочтительно, по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Константные области (CH) каждой из первой и второй тяжелой цепи могут содержать область CH3, и при этом две области CH3 содержат асимметричные мутации.

В указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368,

K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, может быть заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH), по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, может быть заменена. Согласно конкретным вариантам осуществления, первая и вторая тяжелые цепи не имеют замен в одинаковых положениях.

Связывающее средство может представлять собой средство, в котором (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой L в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), и аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой R в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

В способе по настоящему изобретению, связывающее средство может представлять собой средство, которое индуцирует опосредованную Fc эффекторную функцию в меньшей степени, по сравнению с другим антителом, содержащим такие же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области (CH) тяжелой цепи, содержащие шарнир, области CH2 и CH3 IgG1 человека.

В частности, в способе можно использовать связывающее средство, в котором указанные константные области (CH) первой и второй тяжелой цепи являются модифицированными таким образом, что антитело индуцирует опосредованную Fc эффекторную функцию в меньшей степени, по сравнению с антителом, которое является идентичным, за исключением содержания немодифицированных константных областей (CH) первой и второй тяжелой цепи. В частности, каждая или обе из указанных немодифицированных константных областей (CH) первой и второй тяжелой цепи могут содержать, состоять из или по существу состоять из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

Опосредованную Fc эффекторную функцию можно определять посредством измерения связывания связывающего средства с рецепторами Fc γ , связывания с C1q или индукции опосредованного Fc перекрестного связывания рецепторов Fc γ . В частности, опосредованную Fc эффекторную функцию можно определять посредством измерения связывания связывающего средства с C1q.

Константные области первой и второй тяжелой цепи связывающего средства могут являться модифицированными таким образом, что связывание C1q с указанным антителом уменьшено, по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно, уменьшено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100%, причем связывание C1q, предпочтительно, определяют посредством ELISA.

Связывающее средство, используемое в способе, представленном в настоящем документе, может представлять собой средство, в котором, по меньшей мере в одной из указанных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH), одна или более аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно.

В связывающем средстве, используемом по настоящему изобретению, положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, могут представлять собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

В частности, положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, могут представлять собой F, E и A, соответственно, в указанных константных областях первой и второй тяжелой цепи (HC).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, из обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F и E, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой L.

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, из обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой L.

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

- a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 30 [IgG1-FC],
- b) подпоследовательности из последовательности в a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в a); и
- c) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 31 [IgG1-F405L],

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или С-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 9 замен, например, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 или 32 [IgG1-F409R]

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или С-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 33 [IgG1-Fc_FEA],

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или С-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 7 замен, например, самое большее, 6 замен, самое большее, 5, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 34 [IgG1-Fc_FEAL],

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или С-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 6 замен, например, самое большее, 5 замен, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 35 [IgG1-Fc_FEAR]

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делементированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 6 замен, например, самое большее, 5 замен, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может содержать константную область легкой цепи каппа (κ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может содержать константную область легкой цепи лямбда (λ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором легкая цепь каппа (κ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21,

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делементированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

Связывающее средство, используемое в способе по настоящему изобретению, может представлять собой средство, в котором легкая цепь лямбда (λ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22,

b) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или С-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например самое большее 9 замен, самое большее 8, самое большее 7, самое большее 6, самое большее 5, самое большее 4 замен, самое большее 3, самое большее 2 или самое большее 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или b).

Связывающее средство может принадлежать к изотипу, выбранному из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В частности, связывающее средство может представлять собой полноразмерное антитело IgG1.

Согласно предпочтительным в настоящее время вариантам осуществления, антитело принадлежит к аллотипу IgG1m(f).

Субъект, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, представляет собой субъекта-человека.

Опухоль или рак представляет собой солидную опухоль.

Опухоль или рак могут быть выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почки, рака уротелия, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака яичника, рака эндометрия, рака предстательной железы, рака полового члена, рака шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы из клеток Меркеля и мезотелиомы.

Согласно конкретным вариантам осуществления, опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака уротелия (рака мочевого пузыря, мочеочника, мочеиспускательного канала или почечной лоханки), рака эндометрия (EC), рака молочной железы (например, трижды отрицательного рака молочной железы (TNBC)), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани) и рака шейки матки.

Опухоль или рак может, в частности, представлять собой рак легкого.

Рак легкого может представлять собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC.

Рак легкого является наиболее распространенным злокачественным новообразованием и наиболее распространенной причиной смерти из-за рака во всем мире. Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) насчитывает 85-90% из всех случаев рака легкого (Jemal et al., 2011). Частота пятилетней выживаемости для NSCLC составляет приблизительно 18% (SEER, 2018). Главные гистологические подтипы NSCLC включают аденокарциному, плоскоклеточную карциному, аденосквамозную карциному, крупноклеточную карциному, карциноидную опухоль и другие менее распространенные подтипы, причем аденокарцинома является наиболее распространенной.

Стандарт лечения для пациентов с находящимся на поздних стадиях или метастазирующим NSCLC, которые имели прогрессирование при нацеленной терапии или больше не являются кандидатами для нацеленной терапии, как правило, включает химиотерапию на основе платины. Для комбинаций платины

получали общую частоту ответа (ORR) приблизительно 25-35%, время до прогрессирования (TTP) 4-6 месяцев, и медианную выживаемость 8-10 месяцев.

Мутации/изменения генов опухолей были идентифицированы и оказывают влияние на выбор терапии. Идентификация специфических мутаций или изменений в генах в опухоли, таких как киназа анапластической лимфомы (ALK), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), онкоген с-ROS 1 (ROS1), BRAF, KRAS и лиганд-1 программируемой смерти (PD-L1), способствует выбору потенциально эффективных видов нацеленной терапии, в то же время избегая применения видов терапии, маловероятно обеспечивающих клиническое преимущество (NCCN, 2018с). Активирующие сенсibiliзирующие мутации EGFR являются прогностическими для ответа на ингибиторы тирозинкиназы (TKI) EGFR (например, gefitinib, erlotinib, afatinib и osimertinib). Сходным образом, TKI (например, alectinib, ceritinib и crizotinib) являются эффективными видами терапии в случае мутаций ALK и ROS1 и одобрены также в качестве терапии первой линии для соответствующих мутаций. Антитела - ингибиторы контрольной точки (например, pembrolizumab и nivolumab), которые блокируют взаимодействие PD 1 и PD-L1, также были показаны в качестве эффективного лечения, отдельно или в комбинации с химиотерапией, для лечения пациентов с находящимся на поздних стадиях или метастазирующим NSCLC, опухоли которых экспрессируют PD-L1.

Несмотря на множество вариантов лечения, пациенты с NSCLC стадии IV, в конечном счете, имеют плохой прогноз, и рак легкого остается лидирующей причиной смерти из-за рака как для мужчин, так и для женщин. Частота лечения уменьшается с каждой линией терапии, по мере того, как пациенты погибают из-за своих раков или испытывают ухудшение состояния здоровья, которое делает дальнейшее лечение невозможным.

Рак легкого может представлять собой NSCLC, который не имеет сенсibiliзирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации при анапластической лимфоме (ALK)/реаранжировки ROS1. Сенсibiliзирующие мутации EGFR относятся к мутациям, которые придают чувствительность к ингибиторам тирозинкиназы (TKI) EGFR, таким как одобренные ингибиторы тирозинкиназы erlotinib, osimertinib, gefitinib, olmutinib, nazartinib и авитиниб.

Аминокислотная последовательность рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 27.

Сенсibiliзирующая мутация в аминокислотной последовательности рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) может быть выбрана из группы, состоящей из:

i) делеции в рамке считывания и, необязательно, вставки одной или более аминокислот в положении 746-751, такой как любая из делеций и вставок, определенных в таблице 4,

ii) замены одной аминокислоты в любом из положений 709, 715, 719, 720, 768, 858 и 861, такой как любая из делеций и вставок, определенных в таблице 5, и

iii) дубликации и/или вставки в рамке считывания, выбранной из дубликаций/вставок, определенных в таблице 6;

нумерация аминокислот со ссылкой на нумерацию аминокислот в SEQ ID NO: 27.

Обозначение	Аминокислотная замена
Δ1	E746-A750 дел.
Δ2	E746-A750 дел.

Δ3	L747–T751 дел.
Δ4	L747–E749 дел. P вст.
Δ5	L747–T750 дел. P вст.
Δ6	L747–S752 дел. S вст.
Δ7	E746–T751 дел. V вст.
Δ8	L747–S752 дел.
Δ9	E746–T751 дел. I вст.
Δ10	E746–A750 дел. V вст.
Δ11	L747–S752 дел. Q вст.

Таблица 4: Делеции в рамке считывания в экзоне 19 гена EGFR человека (адаптировано из Shigematsu *et al.*, Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers, JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 97, Issue 5, 2 March 2005).
дел. = делеция; вст. = вставка.

Обозначение	Аминокислотная замена
M1	L858R
M2	E709V
M3	I715S
M4	G719C
M5	G719S
M6	G719A
M7	S720F
M8	S768I
M9	L861Q

Таблица 5: Однонуклеотидные замены и полученные в результате аминокислотные замены в экзоне 21 гена EGFR человека (адаптировано из Shigematsu *et al.*, Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers, JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 97, Issue 5, 2 March 2005).

Обозначение	Аминокислотная замена
D1	ASV770-772 вст.
D2	H774 вст.
D3	G771 вст.
D4	CV770-771 вст.
D5	NP773-774 вст., H775Y

D6	PH774-775 вст.
D7	NPH774-776 вст.
D8	HV775-776 вст.

Таблица 6: Дубликации и/или вставки в рамке считывания в экзоне 20 гена EGFR человека (адаптировано из Shigematsu *et al.*, Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers, JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 97, Issue 5, 2 March 2005). вст. = вставка.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться по меньшей мере одной мутацией, и/или субъект, подвергаемый лечению, может иметь по меньшей мере одну мутацию в аминокислотной последовательности EGFR, выбранную из L747S, D761Y, T790M, C797S, T854A, такую как T790M, C797S, D761Y, и двойные мутации T790M/D761Y и T790/C797S; нумерация аминокислот со ссылкой на нумерацию аминокислот в SEQ ID NO: 27.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться экспрессией рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), выбранного из группы, состоящей из:

- i. EGFR человека дикого типа; например, EGFR человека, содержащего последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, или его зрелого полипептида; и
- ii. EGFR человека, который представляет собой вариант EGFR по пункту i и который, по сравнению с EGFR по пункту I, не имеет никаких сенсibiliзирующих мутаций.

Немелкоклеточный рак легкого может представлять собой рак, который не характеризуется сенсibiliзирующей мутацией рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), выбранной из группы, состоящей из:

- i) делеции в рамке считывания и, необязательно, вставки одной или более аминокислот в положении 746-751, такой как любая из делеций и вставок, определенных в таблице 4,
- ii) замены одной аминокислоты в любом из положений 709, 715, 719, 720, 768, 858 и 861, такой как любая из делеций и вставок, определенных в таблице 5, и
- iii) дубликации и/или вставки в рамке считывания, выбранной из дубликаций/вставок, определенных в таблице 6;

нумерация аминокислот со ссылкой на нумерацию аминокислот в SEQ ID NO: 27. Подобным образом, субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может представлять собой субъекта, не имеющего такой сенсibiliзирующей мутации EGFR.

Немелкоклеточный рак легкого может представлять собой рак, который не характеризуется мутацией в аминокислотной последовательности EGFR, выбранной из L747S, D761Y, T790M, C797S, T854A, например, из T790M, C797S, D761Y, и двойных мутаций T790M/D761Y и T790/C797S; нумерация аминокислот со ссылкой на нумерацию аминокислот в SEQ ID NO: 27. Подобным образом, субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может представлять собой субъекта, не имеющего никаких из указанных мутаций.

Немелкоклеточный рак легкого и/или субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может характеризоваться наличием мутации в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), которая приводит к реаранжировке гена, кодирующего ALK (UniProt Q9UM73), с геном, кодирующим партнера по слиянию, с формированием слитого онкогена.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться мутацией, и/или субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может иметь мутацию в гене, кодирующем ALK, при этом, указанная мутация приводит к реаранжировке гена, кодирующего ALK, с геном (EML4), кодирующим белок 4, подобный белку иглокожих, ассоциированному с микротрубочками (EMAPL4) (UniProt Q9HC35) (и формированию слитого онкогена EML4-ALK).

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться мутацией, и/или субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может иметь мутацию в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), приводящую к реаранжировке гена, кодирующего ALK, с геном, выбранным из группы, состоящей из

- i. KIF5B, кодирующего тяжелую цепь кинезина-1 (KINH) (UniProt P33176),
 - ii. KLC1, кодирующего легкую цепь 1 кинезина (KLC1) (UniProt Q07866),
 - iii. TFG, кодирующего белок TFG (UniProt Q92734),
 - iv. TPR, кодирующего нуклеопротеин TPR (UniProt P12270),
 - v. HIP1, кодирующего взаимодействующий с белком хореи Гентингтона белок 1 (HIP-1) (UniProtKB - O00291),
 - vi. STRN, кодирующего стриатин (UniProtKB - O43815),
 - vii. DCTN1, кодирующего субъединицу 1 динактина (UniProt Q14203),
 - viii. SQSTM1, кодирующего секвестосому-1 (UniProtKB - Q13501),
 - ix. NPM1, кодирующего нуклеофосмин (UniProt P06748),
 - x. BCL11A, кодирующего белок 11A B-клеточной лимфомы/лейкоза (UniProt Q9H165), и
 - xi. BIRC6, кодирующего белок, содержащий бакуловирусный повтор IAP (UniProt Q13490);
- и формированию соответствующего слитого онкогена, выбранного из группы, состоящей из слитого онкогена KIF5B-ALK, слитого онкогена KLC1-ALK, слитого онкогена TFG-ALK, слитого онкогена TPR-ALK, слитого онкогена HIP1-ALK, слитого онкогена STRN-ALK, слитого онкогена DCTN1-ALK, слитого онкогена SQSTM1-ALK, слитого онкогена NPM1-ALK, слитого онкогена BCL11A-ALK и слитого онкогена BIRC6-ALK.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться экспрессией тирозинкиназы ALK дикого типа человека; например, тирозинкиназы ALK человека, которая содержит последовательность, представленную под UniProt Q9HC35, или ее зрелого полипептида.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться отсутствием мутации в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), приводящей к реаранжировке ALK с партнером по слиянию с формированием слитого онкогена, и/или субъект не имеет такую мутацию.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться отсутствием мутации в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), приводящей к реаранжировке гена (EML4), кодирующего белок 4, подобный белку иглокожих, ассоциированному с микротрубочками (EMAPL4) (UniProt Q9HC35), с ALK (UniProt Q9HC35), и формированию слитого онкогена EML4-ALK, и/или субъект может представлять собой субъекта, который не имеет такую мутацию.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться отсутствием мутации в любом гене, выбранном из группы, состоящей из гена, кодирующего тирозинкиназу ALK (ALK), гена (EML4), кодирующего белок 4, подобный белку иглокожих, ассоциированному с микротрубочками (EMAPL4) (UniProt Q9HC35).

Немелкоклеточный рак легкого может представлять собой рак, который не характеризуется мутацией, выбранной из группы, состоящей из

- сенсibiliзирующей мутации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR),
- мутации в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), приводящей к реаранжировке EML4 с ALK и формированию слитого онкогена EML4-ALK,
- мутации в аминокислотной последовательности EGFR, которая индуцирует или придает устойчивость указанному субъекту к одному или более ингибиторам тирозинкиназы EGFR (EGFR-TKI); и субъект мог быть подвергнут лечению с использованием ингибитора белка-1 программируемой клеточной смерти (PD-1)/белка-1 программируемой клеточной смерти (PD-1) (например, ниволумаба, генолимумаба, атезолиумаба, дурвалумаба или авелумаба) или с использованием химиотерапии (например, химиотерапии, включающей платину, таксан, пеметрексед и/или гемцитабин) и мог претерпеть неудачу такого предшествующего лечения.

Немелкоклеточный рак легкого может характеризоваться мутацией, выбранной из группы, состоящей из

- сенсibiliзирующей мутации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR),
- мутации в аминокислотной последовательности EGFR, которая индуцирует или придает устойчивость указанному субъекту к одному или более ингибиторам тирозинкиназы EGFR (EGFR-TKI),
- мутации в гене, кодирующем тирозинкиназу ALK (ALK), приводящей к реаранжировке EML4 с ALK и формированию слитого онкогена EML4-ALK; и

субъект мог быть подвергнут лечению с использованием ингибитора EGFR (например, эрлотиниба, осимертиниба, гефитиниба, олмутиниба, назартиниба и авитиниба) или с использованием ингибитора PD-1/PD-L1 (например, ниволумаба, генолимумаба, атезолиумаба, дурвалумаба или авелумаба) и претерпеть неудачу такого предшествующего лечения.

Субъект был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания, для лечения рака легкого, и испытал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

До подвергания лечению в соответствии с настоящим изобретением, субъекта подвергали химиотерапии на основе платины для лечения рака легкого. Альтернативно, субъект мог не являться подходящим для терапии на основе платины, и его могли подвергать альтернативной химиотерапии, например, лечению с использованием включающего гемцитабин режима.

Субъекта могли подвергать предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения рака легкого, такого как средство(а), нацеленное на белок-1 программируемой клеточной смерти (PD-1)/лиганд-1 программируемой смерти (PD-L1), такого как ингибитор PD-1/PD-L1. Предпочтительно, субъектов должны были подвергать только одному предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1, отдельно или в комбинации.

В частности, субъект мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1. Кроме того, субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

Ингибитор PD-1 и/или PD-L1 может, в частности, содержать антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, способные к связыванию с PD-L1.

Известные ингибиторы PD-1 и/или PD-L1 включают пембролизумаб (Merck & Co), CBT-501 (генолизумаб; Genor Bio/CBT Pharma), ниволумаб (BMS), REGN2810 (цемиплимаб; Regeneron), BGB-A317 (тислелизумаб; BeiGene/Celgene), Amp-514 (MEDI0680) (Amplimmune), TSR-042 (достарлимаб; Tesaro/AnaptysBio), JNJ-63723283/JNJ-3283 (Johnson & Johnson), PF-06801591 (Pfizer), JS-001 (триполибамаб/торипалимаб; Shanghai Junshi Bio), SHR-1210/INCSHR-1210 (камрелизумаб; Incyte corp), PDR001 (спартализумаб; Novartis), BCD-100 (BioCad), AGEN2034 (Agenus), IBI-308 (синтилимаб; Innovent Biologics), RG7446/MPDL-3280A (атезолизумаб; Roche), MSB-0010718C (авелумаб; Merck Serono/Pfizer) и MEDI-4736 (дурвалумаб; AstraZeneca), KN-035 (энвафолимаб; 3DMed/Alphamab Co.).

В частности, субъект мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Альтернативно, субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может представлять собой субъекта, которого не подвергали предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения указанного рака легкого, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, любой из ингибиторов PD-1/PD-L1, перечисленных выше.

Согласно другим вариантам осуществления, опухоль или рак представляет собой рак эндометрия. В США, так же как в других развитых странах, рак эндометрия матки (ЕС) являлся наиболее распространенным гинекологическим злокачественным новообразованием, с увеличивающейся заболеваемостью во всем мире. В Соединенных Штатах, опубликовано по оценкам 60000 новых случаев и более 10000 случаев смерти в 2016 г.. Во всем мире в 2012 г., у 527600 женщин диагностирован ЕС матки. Большинство случаев ЕС идентифицируют на ранней стадии и лечат с использованием хирургии в присутствии или в отсутствие радиотерапии или химиотерапии. Однако, пациенты с заболеванием на поздних стадиях имеют худший прогноз с частотой 5-летней выживаемости менее чем 50% для пациентов с метастазированием в лимфатические узлы и менее чем 20% для пациентов с перитонеальными или отдаленными метастазами.

Многокомпонентная химиотерапия является предпочтительным лечением для метастазирующего, рецидивирующего или сопровождающегося высоким риском заболевания; однако, не существует консенсуса для стандартного режима. Карбоплатин и паклитаксел все больше используют в условиях первой линии против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего или рецидивирующего ЕС. Частоты ответа при использовании карбоплатина и паклитаксела лежат в диапазоне от 40% до 62%, с OS приблизительно 13-29 месяцев. Пациентов, которые имеют прогрессирование при комбинированной терапии или которые являются неспособными переносить многокомпонентную химиотерапию, можно подвергать монотерапии. Однако, для вариантов химиотерапевтических средств в этих условиях получали только умеренную активность, особенно, в условиях второй линии и далее. Частоты ответа на одно средство лежат в диапазоне от 21% до 36% в условиях первой линии и 4% - 27% в условиях второй линии (NCCN, 2018d).

Более недавно, для пембролизумаба показана противоопухолевая активность у пациентов с местнораспространенным или метастазирующим положительным по PD-L1 ЕС, которые испытывали прогрессирование во время или после стандартной терапии

В частности, субъект или рак эндометрия, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может иметь гистологию эпителия эндометрия, включающую: эндометриоидную, серозную, плоскоклеточную, светлоклеточную карциному или карциносаркому.

Субъект мог быть подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания для лечения указанного рака эндометрия и мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Субъект может представлять собой субъекта, который не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения указанного рака эндометрия, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, ингибитор PD-1/PD-L1, выбранный из списка ингибиторов PD-1/PD-L1 выше.

Согласно другим вариантам осуществления, опухоль или рак представляет собой рак уротелия, включая рак мочевого пузыря, мочеточника, мочеиспускательного канала или почечной лоханки.

Субъект мог быть подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания для лечения указанного рака уротелия и мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Субъект мог быть подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения указанного рака уротелия, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, любой из ингибиторов PD-1/PD-L1, перечисленных выше.

Кроме того, субъект может представлять собой субъекта, которого подвергали химиотерапии на основе платины для лечения указанного рака уротелия; т.е. химиотерапии с использованием средства, представляющего собой координационный комплекс платины. Примеры химиотерапии на основе платины включают лечение с использованием цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина.

Субъект может представлять собой субъекта, который не является подходящим для терапии на основе платины и которого подвергали альтернативной химиотерапии, например, лечению с использованием включающего гемцитабин режима.

Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, опухоль или рак представляет собой рак молочной железы, такой как трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC). TNBC, в общем, относится к видам рака молочной железы, лишенным экспрессии рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR), и рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). TNBC может, в частности, являться отрицательным по HER2, например, как определено посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) или определения экспрессии белка посредством иммуногистохимии.

Субъект мог быть подвергнут воздействию по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения против местнораспространенного/метастазирующего заболевания для лечения указанного рака молочной железы, например, по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения, включая режимы, включающие антрациклин, таксан, антимаболизит или ингибитор образования микротрубочек.

В следующих вариантах осуществления, субъект мог быть подвергнут воздействию, самое большее, 4 предшествующих системных режимов лечения против местнораспространенного/метастазирующего

заболевания для лечения указанного рака молочной железы, например, по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения, включая режимы, включающие антрациклин, таксан, антимицетин или ингибитор образования микротрубочек.

Субъект мог быть подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения рака молочной железы, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, любой из ингибиторов PD-/PD-L1, перечисленных выше.

Субъект мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после указанного предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения рака молочной железы, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Согласно другим вариантам осуществления, субъект может представлять собой субъекта, который не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения рака молочной железы, такого как субъект, который не был подвергнут лечению с использованием средства(в), нацеленного на PD-1/PD-L, такого как ингибитор PD-1/PD-L1; например, ингибиторы PD-/PD-L1, перечисленные выше.

Опухоль или рак может представлять собой рак головы и шеи, такой как плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN). Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN) является значительной причиной смерти с более 600000 случаев, диагностируемых ежегодно во всем мире. В 2018 г., приблизительно у 64690 человек могут развиваться раки полости рта, глотки или гортани в США, и по оценкам, 13740 случаев смерти могут произойти на протяжении того же периода. Виды рака головы и шеи могут возникать в полости рта, глотке, гортани, полости носа, околоносовых пазухах, щитовидной и слюнных железах. Употребление табака и алкоголя сильно увеличивает риск развития рака головы и шеи. Кроме того, инфекция папилломавируса человека (HPV) имеет этиологическую ассоциацию с плоскоклеточными раками ротоглотки (в частности, миндалин и корня языка), и недавнее доказательство позволяет предполагать, что HPV может также являться ассоциированным с увеличенным риском плоскоклеточной карциномы гортани. Пациенты с локально положительными по HPV видами рака головы и шеи имеют лучшие исходы для ответа на лечение, PFS и OS, по сравнению с отрицательными по HPV опухолями.

Лечение видов рака головы и шеи является комплексным и требует многодисциплинарного подхода. Прогноз для пациентов с рецидивирующей или метастазирующей SCCHN является, как правило, плохим, с медианной выживаемостью приблизительно 6 - 12 месяцев, в зависимости от функционального статуса пациента и связанных с заболеванием факторов. Терапия первой линии для подходящих пациентов включает цетуксимаб с цисплатином или карбоплатином плюс 5-фторурацил (5-FU). Добавление цетуксимаба приводило к продленной выживаемости, по сравнению с платиной и 5-FU отдельно (10,1 месяцев против 7,4 месяцев) так же как к продленной mPFS (3,3 месяцев против 5,6 месяцев). Химиотерапия с одним средством рекомендована для пациентов с худшим функциональным статусом. В прошлом, наиболее широко используемые средства для монотерапии включали соединения платины, таксаны, напаклитаксел, метотрексат, фторурацил и цетуксимаб.

В США и нескольких других странах, пембролизумаб и ниволумаб одобрены для пациентов с прогрессирующим заболеванием (PD) после включающей платину химиотерапии. В то время как данные исследований, изучающих активность нацеленного на PD-1 отдельного средства, кажутся обнадеживающими, частоты ответа остаются низкими.

В частности, опухоль или рак может представлять собой рецидивирующую или метастазирующую SCCHN.

Согласно конкретным вариантам осуществления, относящимся к SCCHN, опухоль или рак представляет собой рак полости рта, глотки или гортани.

Субъект мог быть подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания для лечения SCCHN и мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Субъект мог быть подвергнут химиотерапии на основе платины для лечения SCCHN, такой как лечение с использованием цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина.

Альтернативно, субъект мог не являться подходящим для терапии на основе платины и мог быть подвергнут альтернативной химиотерапии для лечения SCCHN.

Субъект может представлять собой субъекта, который был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки для лечения SCCHN, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, ингибиторы PD-/PD-L1, перечисленные выше.

Субъект мог испытывать прогрессирование заболевания во время или после указанного предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Согласно другим вариантам осуществления субъект может представлять собой субъекта, который не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, субъекта, который не был подвергнут лечению с использованием любого из ингибиторов PD-/PD-L1, перечисленных выше.

Согласно следующим вариантам осуществления, опухоль или рак представляет собой рак шейки матки. Рак шейки матки выдвигает значительную медицинскую проблему во всем мире, с оцененной заболеваемостью более чем 500000 новых случаев. В США, оценивают возникновение приблизительно 12800 новых случаев и 4210 случаев смерти в 2017 г.. Рак шейки матки имеет медианный возраст диагноза 49 лет в США и даже более низкий в развивающихся странах. В то время как частота 5-летней выживаемости для пациентов в США с диагнозом локализованного заболевания составляет 91%, прогноз для пациентов с находящимся на поздних стадиях заболеванием остается плохим. Частоты пятилетней выживаемости для находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания составляют менее чем 35%.

Лечение первой линии для рецидивирующего или метастазирующего рака шейки матки состоит из бевацизумаба в комбинации с паклитакселом и платиной (цисплатином или карбоплатином) или паклитакселом и топотеканом. Несмотря на 48% ORR и медианное OS приблизительно 18 месяцев, почти все пациенты испытывают рецидив после этого лечения первой линии. Для терапии второй линии, пембролизумаб одобрен в США для лечения пациентов с рецидивирующим или метастазирующим раком шейки матки с прогрессированием заболевания во время или после химиотерапии, и пациентов, опухоли которых экспрессируют PD-L1, как определено посредством одобренного FDA теста. Не существует доступных одобренных дополнительных видов терапии, однако, пациентов часто подвергают лечению с использованием вариантов монотерапии, включающих, но без ограничения, пеметрексед, топотекан,

доцетаксел, наб-паклитаксел, винорелбин и, в некоторых случаях, бевацизумаб. Частоты ответа при лечении одним средством являются очень низкими (диапазон: 0-15%) и по этой причине, рак шейки матки остается популяцией с очень высокими неудовлетворенными медицинскими нуждами.

Рак шейки матки может, в частности, иметь плоскоклеточную, аденокарциномную или аденосквамозную гистологию.

Субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может представлять собой субъекта, который был подвергнут воздействию по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания для лечения указанного рака шейки матки, такого как химиотерапия в комбинации с лечением, нацеленным на фактор А роста эндотелия сосудов, таким как лечение с использованием бевацизумаба, и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

Субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, может представлять собой субъекта, подвергнутого воздействию, самое большее, 4 предшествующих системных режимов лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания, включая химиотерапию в комбинации с лечением, нацеленным на фактор А роста эндотелия сосудов, таким как лечение с использованием бевацизумаба.

Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект, подвергаемый лечению по настоящему изобретению, представляет собой субъекта, который не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1; например, субъекта, который не был подвергнут лечению с использованием любого из ингибиторов PD-/PD-L1, перечисленных выше.

Предпочтительно, субъект представляет собой женщину.

Связывающее средство, используемое в соответствии с настоящим изобретением, можно, в частности, вводить посредством системного введения.

Предпочтительно, связывающее средство вводят указанному субъекту посредством внутривенной инъекции или инфузии.

Каждый цикл лечения может составлять две недели (14 суток), три недели (21 сутки) или четыре недели (28 суток).

Согласно конкретным вариантам осуществления изобретения, каждую дозу вводят или вводят посредством инфузии каждую вторую неделю (1Q2W), каждую третью неделю (1Q3W) или каждую четвертую неделю (1Q4W).

Согласно некоторым вариантам осуществления, одну дозу или каждую дозу вводят или вводят посредством инфузии на сутки 1 каждого цикла лечения

Каждую дозу можно вводить или вводить посредством инфузии в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, минимум 90 минут, минимум 120 минут или минимум 240 минут.

Согласно следующему аспекту, настоящее изобретение относится к композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащей связывающее средство, содержащее первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека, в которой количество связывающего средства в композиции составляет около 25-400 мг или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль, например, 25-400 мг или $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль.

Количество связывающего средства, введенное в указанной композиции, может, в частности, составлять

около 25-320 мг или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль, например, 25-320 мг или $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль;
 около 30-320 мг или около $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль; например, 30-320 мг или $2,4 \times 10^{-7}$ - $2,2 \times 10^{-6}$ моль
 около 40-260 мг или около $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль, например, 40-260 мг или $2,7 \times 10^{-7}$ - $1,8 \times 10^{-6}$ моль;
 около 50-200 мг или около $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль, например, 50-200 мг или $3,4 \times 10^{-7}$ - $1,4 \times 10^{-6}$ моль;
 около 60-140 мг или около $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль, например, 60-140 мг или $4,1 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль;
 около 70-140 мг или около $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль, например, 70-140 мг или $4,8 \times 10^{-7}$ - $9,5 \times 10^{-7}$ моль;
 около 80-120 мг или около $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль, например, 80-120 мг или $5,5 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль;
 около 90-110 мг или около $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль, например, 90-110 мг или $6,1 \times 10^{-7}$ - $7,5 \times 10^{-7}$ моль;
 около 95-105 мг или около $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль, например, 95-105 мг или $6,5 \times 10^{-7}$ - $7,2 \times 10^{-7}$ моль;
 около 65-120 мг или около $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль, например, 65-120 мг или $4,4 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-7}$ моль;
 около 70-100 мг или около $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль, например, 70-100 мг или $4,8 \times 10^{-7}$ - $6,8 \times 10^{-7}$ моль;
 или около 75-90 мг или около $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль, например, 75-90 мг или $5,1 \times 10^{-7}$ - $6,1 \times 10^{-7}$ моль.

Композицию или фармацевтическую композицию можно составлять с использованием носителя, наполнителя и/или разбавителя, так же как любых других компонентов, пригодных для фармацевтических композиций, включая известные адъюванты, в соответствии с общепринятыми способами, такими как описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, так же как любые известные адъюванты и наполнители, должны являться пригодными для антителя или конъюгата антителя по настоящему изобретению и выбранного способа введения. Применимость носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного отрицательного влияния на желательные биологические свойства выбранных соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем значительного влияния [10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования и т.д.] при связывании антигена).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белков аминокислоты), консерванты, солюбилизаторы и/или другие материалы, пригодные для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители включают все без исключения пригодные растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, антиоксиданты и замедляющие абсорбцию средства, и аналогичные средства, которые являются физиологически совместимыми с соединением по настоящему изобретению.

Примеры пригодных водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и аналогичные), и их пригодные смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного использования стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных

веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо общепринятые среды или средства являются несовместимыми с активным соединением, предусматривают их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и аналогичные; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и аналогичные; и (3) хелатирующие металлы средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, виннокаменная кислота, фосфорная кислота и аналогичные.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать изотонические средства, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия, в композициях.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также содержать одно или более вспомогательных средств, подходящих для выбранного способа введения, таких как консерванты, увлажняющие средства, эмульгаторы, диспергирующие средства, консерванты или буферы, которые могут увеличивать срок хранения или эффективность композиции. Комбинацию соединений по настоящему изобретению можно получать с использованием носителей, которые могут защищать соединение против быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая импланты, чрескожные пластыри и микроинкапсулированные системы для доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота, отдельно или с воском или другими материалами, хорошо известными в данной области. Способы получения таких составов, в общем, известны специалисту в данной области, см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Согласно одному варианту осуществления, связывающее средство, используемое в соответствии с настоящим изобретением, можно формулировать для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного использования стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области. До тех пор пока исключены случаи, когда какие-либо общепринятые среды или средства являются несовместимыми с активным соединением, предусматривают их применение в композициях по настоящему изобретению. Другие активные или терапевтические соединения можно также включать в композиции.

Фармацевтические композиции для инъекций должны, как правило, являться стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композицию можно формулировать в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водные или неводные растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и аналогичные), и их подходящие смеси, растительные масла, такие

как оливковое масло, и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии, и посредством использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях, может являться предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как глицерин, маннит, сорбит или хлорид натрия, в композицию. Длительной абсорбции пригодных для инъекций композиций можно достигать посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина. Стерильные пригодные для инъекций растворы можно получать посредством введения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, например, как перечислено выше, по необходимости, с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекций растворов, примерами способов получения являются сушка в вакууме и сушка замораживанием (лиофилизация), посредством которых получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из их предварительно стерилизованного посредством фильтрации раствора.

Стерильные пригодные для инъекций растворы можно получать посредством введения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекций растворов, примерами способов получения являются сушка в вакууме и сушка замораживанием (лиофилизация), посредством которых получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из их предварительно стерилизованного посредством фильтрации раствора.

Согласно одному варианту осуществления, композиция по настоящему изобретению содержит около $5,5 \times 10^{-7}$ моль или около 80 мг указанного связывающего средства, например, $5,5 \times 10^{-7}$ моль или 80 мг.

Согласно предпочтительному в настоящее время варианту осуществления, композиция по настоящему изобретению содержит около $6,8 \times 10^{-7}$ моль или около 100 мг указанного связывающего средства, например, $6,8 \times 10^{-7}$ моль или 100 мг указанного связывающего средства.

В композиции по настоящему изобретению связывающее средство может являться таким, как определено выше; например, связывающее средство может содержать любую из переменных областей и константных областей, определенных выше.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к единичной лекарственной форме связывающего средства или композиции, как раскрыто выше

Предпочтительно, единичная лекарственная форма предназначена для системного введения. Согласно конкретным вариантам осуществления, единичная лекарственная форма предназначена для инъекции или инфузии, такой как внутривенная инъекция или инфузия, субъекту.

В композиции или единичной лекарственной форме, связывающее средство, предпочтительно, находится в водном растворе, например, в 0,9% NaCl (солевом растворе). Единичная лекарственная форма может иметь объем 50-500 мл, например, 50-250 мл, 50-500 мл, 100-500 мл или 100-250 мл.

Согласно следующему аспекту, настоящее изобретение относится к связывающему средству для применения в лечении рака, содержащему первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека.

Связывающее средство можно вводить в подходящих количествах. В частности, количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, может составлять

- a) около 0,3-5 мг/кг массы тела или около 25-400 мг суммарно; и/или
- b) около $2,1 \times 10^{-9}$ - $3,4 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

Предпочтительно, количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

- a) около 1,25 мг/кг массы тела или около 100 мг суммарно, например, 1,25 мг/кг массы тела или 100 мг суммарно; и/или
- b) около $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно, например, $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

Дополнительные пункты по настоящему описанию включают:

1. Способ уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли, или лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего средства,

в котором связывающее средство содержит первую антигенсвязывающую область, которая связывает CD137 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывает PD-L1 человека, в котором связывающее средство вводят по меньшей мере в одном цикле лечения, и в котором терапевтически эффективное количество связывающего средства составляет

- (i) от около 25 мг до около 400 мг суммарно; или
- (ii) от около $1,7 \times 10^{-7}$ моль до около $2,7 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

2. Способ по пункту 1, в котором терапевтически эффективное количество связывающего средства составляет

- (i) от около 80 мг до около 240 мг суммарно; или
- (ii) от около $5,5 \times 10^{-7}$ моль до около $1,6 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

3. Способ по пункту 1, в котором терапевтически эффективное количество связывающего средства составляет

- (i) около 80 мг суммарно; или
- (ii) около $5,5 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

4. Способ по пункту 1, в котором терапевтически эффективное количество связывающего средства составляет

- (i) около 100 мг суммарно; или
- (ii) около $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

5. Способ по любому из пунктов 1-4, в котором

a) первая антигенсвязывающая область содержит варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 (HCDR1), CDR2 (HCDR2) и CDR3 (HCDR3), и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 (LCDR1), CDR2 (LCDR2) и CDR3 (LCDR3);

в которой HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 2, в которой HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 3, в которой HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 4, в которой LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 6, в которой LCDR2 содержит аминокислотную последовательность GAS, и в которой LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 7;

b) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1 (HCDR1), CDR2 (HCDR2) и CDR3 (HCDR3), и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 (LCDR1), CDR2 (LCDR2) и CDR3 (LCDR3);

в которой HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 9, в которой HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 10, в которой HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 11, в которой LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 13, в которой LCDR2 содержит аминокислотную последовательность DDN, и в которой LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 14.

6. Способ по любому из пунктов 1-4, в котором первая связывающая область содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 1, и

(ii) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 5;

в котором вторая связывающая область содержит:

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, в соответствии с SEQ ID NO: 8, и

(iv) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 12.

7. Способ по любому из пунктов 1-6, в котором первая связывающая область содержит

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 1, и

(ii) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 5;

в котором вторая связывающая область содержит:

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 8, и

(iv) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 12.

8. Способ по любому из пунктов 1-7, в котором связывающее средство содержит:

(1) первый полипептид, содержащий:

(a) первую тяжелую цепь, содержащую первую переменную область тяжелой цепи (VH1) и первую константную область тяжелой цепи (CH1), и

(b) первую легкую цепь, содержащую первую переменную область легкой цепи (VL1) и первую константную область легкой цепи (CL1); и

(2) второй полипептид, содержащий:

(c) вторую тяжелую цепь, содержащую вторую переменную область тяжелой цепи (VH2) и вторую константную область тяжелой цепи (CH2), и

(d) вторую легкую цепь, содержащую вторую переменную область легкой цепи (VL2) и константную область второй легкой цепи (CL2);

в которой VH1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 1,

в которой VL1 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 5,

в которой VH2 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 8, и

в которой VL2 содержит аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 12.

9. Способ по пункту 8, в котором CH1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, в соответствии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 19 или 34, в которой между 1 и 10 последовательных аминокислот делетированы, и

в котором CH2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности, в соответствии с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 20 или 35, в которой между 1 и 10 последовательных аминокислот делетированы.

10. Способ по любому из пунктов 1-9, в котором связывающее средство представляет собой антитело или его фрагмент.

11. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

12. Способ по пункту 11, в котором субъект с NSCLC:

(i) был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения;

(ii) имеет гистологический или цитологический диагноз неплоскоклеточного NSCLC, который не имеет сенсibiliзирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации при анапластической лимфоме (ALK)/реаранжировки ROS1;

(iii) был подвергнут терапии на основе платины или альтернативной химиотерапии из-за несоответствия установленным для платины требованиям; и

(iv) имеет показанное прогрессирование заболевания при предшествующем лечении с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

13. Способ по пункту 11, в котором субъект с NSCLC:

(i) был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения;

(ii) имеет гистологический или цитологический диагноз неплоскоклеточного NSCLC, который не имеет сенсibiliзирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации при анапластической лимфоме (ALK)/реаранжировки ROS1;

(iii) был подвергнут терапии на основе платины или альтернативной химиотерапии из-за несоответствия установленным для платины требованиям; и

(iv) не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

14. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой рак уротелия (UC).

15. Способ по пункту 14, в котором субъект с UC:

(i) был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения;

(ii) имеет показанное прогрессирование заболевания при предшествующем лечении с использованием ингибитора PD-1/PD-L1; и

(iii) либо был подвергнут химиотерапии на основе платины, либо является неподходящим для любой химиотерапии на основе платины или любой включающей цисплатин химиотерапии.

16. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой рак эндометрия (EC).

17. Способ по пункту 16, в котором субъект с EC:

(i) был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения;

(ii) имеет гистологию эпителия эндометрия, включающую: эндометриоидную, серозную, плоскоклеточную, светлоклеточную карциному или карциносаркому; и

(iii) не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

18. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC).

19. Способ по пункту 18, в котором субъект с TNBC:

(i) имеет TNBC, определенный как отрицательный по HER2;

(ii) был подвергнут воздействию от одного до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения.

20. Способ по пункту 18, в котором для субъекта с TNBC показано прогрессирование заболевания при предшествующем лечении с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

21. Способ по пункту 18, в котором субъект с TNBC не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

22. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN).

23. Способ по пункту 22, в котором субъект с SCCHN:

(i) был подвергнут воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения; и

(ii) имел прогрессирование заболевания после предшествующего лечения с использованием химиотерапии на основе платины или альтернативной комбинации, если являлся неподходящим для химиотерапии на основе платины.

24. Способ по любому из пунктов 1-10, в котором опухоль или рак у субъекта представляет собой рак шейки матки.

25. Способ по пункту 24, в котором субъект с раком шейки матки:

(i) был подвергнут воздействию от одного до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения;

(ii) имеет рак шейки матки с плоскоклеточной, аденокарциномной или аденосквамозной гистологией; и

(iii) не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1.

26. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором терапевтически эффективное количество связывающего средства вводят при фиксированной дозе, независимо от массы тела.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство вводят посредством системного введения.

28. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство вводят посредством внутривенной инъекции или инфузии.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором каждый цикл лечения составляет три недели (21 сутки).

30. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором одну дозу вводят каждую третью неделю (1Q3W).

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором одну дозу вводят на сутки 1 каждого цикла лечения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Таблица 7

SEQ ID	НАИМЕНОВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLN <u>DY</u> WMSWVRQAPGK GLEWVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKT EDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGLTVTVSS
2	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLN <u>DY</u> W
3	VH_CD137-009-H7_CDR2	IDVGGSL
4	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL
5	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDISSYLAWYQKPGKAPK RLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTDYFTISLQPEDATYYCHYY ATISGLGVAFGGGTKVEIK
6	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS
7	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA
8	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKG LEWVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDDSKNTLFLQMSSLRAE

		DTAVVYCAIPARGYNYGSFQHWGQGLTVTVSS
9	VH-PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA
10	VH-PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT
11	VH-PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
12	VL-PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV LVVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQ VWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
13	VL-PD-L1-547-CDR1	NIGSKS
	VL-PD-L1-547-CDR2	DDN
14	VL-PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV
15	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
16	IgG1-Fc_F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
17	IgG1-Fc_K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
18	IgG1-Fc_FEA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

		TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
19	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVA <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYS <u>RL</u> TVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
20	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVA <u>A</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSF <u>LL</u> YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
21	Каппа-С	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	Лямбда-С	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
23	CD137 человека (UniProtKB - Q07011; вкл. последовательность сигнального пептида: ак 1-23)	MGNSCYNIVALLLVNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICS PCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGF HCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRP WTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAR EPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
24	CD137 человека (UniProtKB - Q07011; зрелая последовательность)	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCK GVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELT KKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDV VCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLF FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE

		GGCEL
25	PD-L1 человека (UniProtKB - Q9NZQ7; вкл. последовательность сигнального пептида: ак 1-18)	MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTEICFPVEK QLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKD QLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY NKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT TTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVI PELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKK CGIQDTNSKKQSDTHLEET
26	PD-L1 человека (UniProtKB - Q9NZQ7; зрелая последовательность)	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTEICKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDK NIIQFVHGEECLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQ DAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEH ELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT TTTNSKREEKLFNVTST LRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVI LGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLE ET
27	EGFR <i>Homo Sapiens</i>	MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTF EDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGY VLIALNTVERIPLNQLIIRGNMYEYNSYALAVLSNYDANKTGLK ELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSM DFQNHGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGR CRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTCPP LMLYNPTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVR ACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISN RGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVD KCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCT YGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGLLLLLVVALGIGLFMRR RHIVRKRTRLRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIK VLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDE AYVMASVDNPHVCRLGLICTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHK DNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTPQ HVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVIKWMALESILHRIYTS DVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTI DVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDE RMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQQGFFSSPSTS RTPLSSLATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGAL TEDSIDDFTLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDP

			HYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAKGSHQISL DNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAELYLRVAPQSSEFIGA
28	VH_CD137-009		QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNDYWMSWVRQAPGKGL EWIGYIDVGGSLYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTAT YFCARGGLTYGFDLWGPGLVTVSS
29	VL_CD137-009		DIVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSYLAWYQQKPGQRPK RLIYGASDLASGVPSRFSASGSGTEYALTISDLESADAATYYCHY YATISGLGVAFGGGTEVVVK
30	IgG1-Fc без C-концевого лизина		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
31	IgG1-Fc_F405L без C- концевого лизина		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-Fc_K409R без C- концевого лизина		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
33	IgG1-Fc_FEA без C-концевого лизина		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
34	IgG1-FEAR-Fc без C- концевого лизина		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG

	концевого лизина	LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVA ^U VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
35	IgG1-FEAL-Fc без концевого лизина	C-ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVA ^U VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано посредством следующих примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение антитела против CD137

Антитела CD137-005 и CD137-009 получали, как раскрыто в примере 1 из WO2016/110584. Кратко, кроликов иммунизировали смесью белков, содержащей слитый белок человеческий CD137-Fc. Отдельные В-клетки из крови подвергали сортировке и скринингу по продукции специфического для CD137 антитела посредством ELISA и проточной цитометрии. Из положительных в скрининге В-клеток, выделяли РНК и проводили секвенирование. Гены переменных областей тяжелой и легкой цепи синтезировали и клонировали в экспрессирующий IgG1 каппа человека вектор или экспрессирующий IgG1 ламбда человека вектор, включая тяжелую цепь IgG1 человека, содержащую следующие мутации аминокислот: L234F, L235E, D265A и F405L (FEAL) или F405L (FEAL) в которой номер положения аминокислоты соответствует нумерации EU, (соответствует SEQ ID NO: 20). Последовательности переменной области химерного антитела против CD137 (CD137-009) показаны в списке последовательностей SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29 в настоящем документе.

Пример 2: Гуманизация кроличьего (химерного) антитела против CD137

Последовательности гуманизованного антитела из антитела кролика против CD137-009 получали в Antitope (Cambridge, UK). Последовательности гуманизованного антитела получали с использованием технологии зародышевой гуманизации (прививки CDR). Гуманизованные гены V-области конструировали на основе человеческих зародышевых последовательностей с наиболее близкой гомологией с аминокислотными последовательностями VH и Vκ кроличьего антитела. Конструировали серии из семи VH и трех Vκ (VL) зародышевых гуманизованных генов V-области. Структурные модели V-областей не относящегося к человеку исходного антитела получали с использованием Swiss PDB и анализировали для идентификации аминокислот в каркасах V-области, которые могут являться важными для свойств связывания антитела. Эти аминокислоты отмечали для включения в один или более вариантов антител с

привитой CDR. Зародышевые последовательности, используемые в качестве основы для вариантов дизайна гуманизации, показаны в таблице 8.

Таблица 8: Наиболее близкое совпадение человеческих зародышевых последовательностей фрагмента V и фрагмента J.

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь (κ)	
	Человеческий зародышевый фрагмент V-области	Человеческий зародышевый фрагмент J-области	Человеческий зародышевый фрагмент V-области	Человеческий зародышевый фрагмент J-области
Кроличье антитело против CD137-009	hIGHV3-49*04	hIGHJ4	hIGKV1-33*01	IGKJ4

Вариант последовательности с наименьшей встречаемостью потенциальных Т-клеточных эпитопов затем выбирали с использованием запатентованных Antitope технологий *in silico*, iTope™ и TCED™ (базы данных Т-клеточных эпитопов) (Perry, L.C.A, Jones, T.D. and Baker, M.P. New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development (2008). *Drugs in R&D* 9 (6): 385-396; 20 Bryson, C.J., Jones, T.D. and Baker, M.P. Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins (2010). *Biodrugs* 24 (1):1-8). Наконец, нуклеотидные последовательности сконструированных вариантов подвергали оптимизации кодонного состава.

Последовательности вариабельной области гуманизированного антитела против CD137 (CD137-009-NC7LC2) показаны в списке последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5 в настоящем документе.

Пример 3: Получение антитела против PD-L1

Иммунизацию и получение гибридом проводили в Aldevron GmbH (Freiburg, Germany). кДНК, кодирующую аминокислоты 19-238 из PD-L1, человека клонировали в запатентованные Aldevron экспрессирующие плазмиды. Антитело PD-L1-547 получали посредством иммунизации животных OmniRat (трансгенных крыс, экспрессирующих диверсифицированный репертуар антител с полностью человеческими идиотипами; Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, USA) с использованием внутрикожного введения покрытых кДНК PD-L1 человека частиц золота с использованием ручного устройства для бомбардировки частицами («генной пушки»). Образцы сыворотки собирали после серий иммунизаций и тестировали в проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессирующими плазмидами для экспрессии PD-L1 человека. Продуцирующие антитело клетки выделяли и сливали с клетками миеломы мыши (Ag8), в соответствии со стандартными способами. РНК из гибридом, продуцирующей специфическое для PD-L1 антитело, выделяли и проводили секвенирование. Гены вариабельных областей тяжелой и легкой цепи (SEQ ID NO: 8 и 12) синтезировали и клонировали в экспрессирующий IgG1 ламбда человека вектор, включая тяжелую цепь IgG1 человека, содержащую следующие мутации аминокислот: L234F, L235E, D265A и K409R (FEAR) в которой положение аминокислоты соответствует нумерации EU, (соответствует SEQ ID NO: 19).

Пример 4: Получение биспецифических антител посредством индуцированного 2-МЕА обмена плеч Fab

Биспецифические IgG1 антитела получали посредством обмена плеч Fab в контролируемых восстанавливающих условиях. Основой для этого способа является использование комплементарных доменов CH3, которые способствуют формированию гетеродимеров в специфических условиях анализа, как раскрыто в WO2011/131746. Мутации F405L и K409R (нумерация EU) вводили в соответствующие антитела для получения пар антител с комплементарными доменами CH3.

Для получения биспецифических антител, два исходных комплементарных антитела, каждое антитело в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламина-HCl (2-MEA) в общем объеме 100 мкл PBS при 31°C в течение 5 часов. Реакцию восстановления останавливали посредством удаления восстанавливающего средства 2-MEA с использованием колонок для центрифугирования (фильтры для центрифугирования Microcon, 30k, Millipore), в соответствии с протоколом производителя.

Биспецифические антитела получали посредством комбинирования следующих антител из примеров 1 и 4:

- антитело CD137-009-FEAL в комбинации с антителом PD-L1-547-FEAR
- антитело PD-L1-547-FEAL в комбинации с антителом CD137-009-FEAR
- антитело GEN1046 (PD-L1-547-FEAL в комбинации с антителом CD137-009-HC7LC2-FEAR),
- антитело b12-FEAL в комбинации с антителом PD-L1-547-FEAR, с антителом CD137-009-FEAR или с антителом CD137-009-HC7LC2-FEAR, с использованием в качестве первого плеча антитела b12, представляющего собой специфическое для gp120 антитело (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23)
- PD-L1-547-FEAL или CD137-009-FEAL с антителом b12-FEAR.

Пример 5: Одновременное связывание GEN1046 с экспрессирующими PD-L1 и CD137 клетками

Для измерения зависимости ответа от дозы для одновременного связывания GEN1046 с экспрессирующими PD-L1 и CD137 человека клетками, трансгенные клетки K562 метили различными флуоресцентными красителями, и формирование дублетов анализировали посредством проточной цитометрии.

Клетки K562, трансгенные по PD-L1 человека (K562_hPD-L1; 6×10^6 клеток), флуоресцентно метили с использованием набора для исследования пролиферации клеток с CellTrace™ фиолетовым (кат. по. C34557, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) в 2 мл 2,5 мкМ раствора для окрашивания в течение 10 минут при 37°C. Параллельно, клетки K562, трансгенные по CD137 человека (K562_h4-1BB; 6×10^6 клеток) флуоресцентно метили с использованием набора для исследования пролиферации клеток с CellTrace™ дальнекрасным (кат. по. C34564, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) в 2 мл 0,5 мкМ раствора для окрашивания в течение 10 минут при 37°C. Окрашивание останавливали посредством добавления 4 мл фетальной бычьей сыворотки (FBS; кат. по. S0115, Biochrom GmbH, Berlin, Germany). После промывки один раз в RPMI1640 (кат. по. 11875093, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany), дополненной 10% FBS, окрашенные клетки K562_hPD-L1 и K562_h4-1BB комбинировали в соотношении 1:1 и довели до $1,25 \times 10^6$ клеток/мл в RPMI1640, 10% FBS. Объединенные клетки K562_hPD-L1 и K562_h4-1BB переносили в полистирольные 5 мл круглодонные пробирки (кат. No. 10579511, Fisher Scientific, Schwerte, Germany) (1×10^6 клеток/пробирку). Клетки инкубировали с серийными разведениями антител (диапазон 0,001 - 100 мкг/мл в шагах 10-кратного разведения) в RPMI1640, 10% FBS при 37°C в течение 15 минут. Образцы немедленно анализировали в проточном цитометре FACS Canto™ II (Becton

Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) без предварительного перемешивания, для сохранения сформированных дублетов. Дублеты K562_hPD-L1/K562_h4-1BB идентифицировали как двойную положительную по CellTrace™ фиолетовому/CellTrace™ дальнекрасному популяцию посредством программного обеспечения FlowJo 10.4. Процент двойных положительных клеток наносили на график как функцию от концентрации антитела с использованием GraphPad Prism версии 8.01 (GraphPad Software, Inc).

На фигуре 1A показано, что добавление GEN1046 индуцировало формирование двойных положительных по CellTrace™ фиолетовому/CellTrace™ дальнекрасному дублетов. Для совместных культур K562_hPD-L1/K562_h4-1BB, инкубированных с промежуточной концентрацией GEN1046 0,1 мкг/мл, показано наиболее выраженное формирование дублета, в то время как только умеренное формирование дублета наблюдали при низкой концентрации GEN1046 0,001 мкг/мл, и от минимального до отсутствующего формирования дублета поддавалось детекции при высокой концентрации GEN1046 100 мкг/мл. Это наблюдение согласуется с колоколообразной кривой зависимости ответа от дозы, показанной на фигуре 1B, перекрывающей тестируемый диапазон концентраций антитела от 0,001 мкг/мл до 100 мкг/мл. В отличие от GEN1046, комбинирование одновалентных контрольных антител против PD-L1 и CD137, PD-L1-547-FEALxb12-FEAR и b12-FEALxCD137-009-NC7LC2-FEAR, приводило к отсутствию формирования дублета при всех тестируемых концентрациях антител.

Пример 6: Эффект GEN1046 в репортерном анализе CD137

Схематическое представление предполагаемого механизма действия биспецифических антител PD-L1xCD137 показано на фигуре 2.

Для определения зависимости ответа от дозы GEN1046 для опосредования зависимой от связывания PD-L1 агонистической активности CD137, репортерный анализ на основе люциферазы активации CD137 проводили с использованием растущих в адгерентных условиях линий клеток опухолей человека в качестве источника PD-L1.

Эндогенно экспрессирующие PD-L1 клетки человека ES-2 (светлоклеточной карциномы яичника; ATCC® CRL-1978™) и MDA-MB-231 (аденокарциномы молочной железы; ATCC® HTB-26™) рассеивали в белые плоскодонные 96-луночные планшеты (кат. No. 136101, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) при плотности 3×10^4 клеток/лунку в DMEM (кат. No. 10566016, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Криоконсервированные репортерные клетки Thaw-and-use GloResponse™ NFkB-Luc2P/4-1BB Jurkat (кат. No. CS196003, Promega GmbH, Walldorf, Germany) размораживали на следующие сутки, и содержимое одной ампулы переносили в 15 мл пробирку, содержащую 9,5 мл предварительно нагретой RPMI-1640, дополненной 1% FBS. Культуральную среду адгерентных клеток ES-2 и MDA-MB-231 отбрасывали, и совместное культивирование начинали посредством посева 50 мкл суспензии клеток NFkB-Luc2P/4-1BB Jurkat поверх монослоя клеток ES-2 или MDA-MB-231. Клетки инкубировали с серийными разведениями антител (диапазон концентраций в анализе 0,00128 - 100 мкг/мл в шагах 5-кратного разведения) в RPMI 1640, 10% FBS при 37°C в течение 6 часов. Затем, планшет для анализа извлекали из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры (RT) в течение 10 минут. Реагент люциферазу Bio-Glo™ (кат. No. G7941, Promega GmbH, Walldorf, Germany) разводили и предварительно нагревали до RT. 75 мкл реагента люциферазы добавляли на лунку и инкубировали в течение 10 минут при RT в темноте. Индуцированную люминесценцию измеряли с использованием считывателя для планшетов Infinite F200 Pro (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany).

При добавлении GEN1046 к совместным культурам репортерных клеток ES-2:Jurkat (фигура 3А) и MDA-MB-231:Jurkat (фигура 3В), экспрессия люциферазы как считывания агонистической активации CD137 была эффективно индуцирована зависимым от концентрации образом, следуя колоколообразной кривой зависимости ответа от дозы. В то время как промежуточный уровень дозы около 0,1 мкг/мл GEN1046 приводил к наиболее выраженным сигналам люминесценции, более низкие уровни дозы, так же как более высокие уровни дозы, являлись менее эффективными для индукции экспрессии люциферазы. Важно, что при очень низких (0,00128 мкг/мл GEN1046) и очень высоких концентрациях GEN1046 (100 мкг/мл GEN1046), экспрессия люциферазы не поддавалась детекции. Для обеих анализированных совместных культур, инкубация с контрольным антителом b12-FEAL приводила к отсутствию экспрессии люциферазы.

Пример 7: Анализ пролиферации поликлональных Т-клеток для измерения эффектов биспецифических антител, связывающих PD-L1 и CD137

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток в поликлонально активированных Т-клетках, PBMC инкубировали с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 (клона UCNT1), для активации Т-клеток, в комбинации с биспецифическим антителом GEN1046 или контрольным антителом. В популяции PBMC, клетки, экспрессирующие PD-L1, могут подвергаться связыванию посредством специфического для PD-L1 плеча биспецифического антитела, в то время как активированные Т-клетки в популяции могут подвергаться связыванию посредством специфического для CD137 плеча. В этом анализе, транс-активацию Т-клеток посредством специфического для CD137 плеча, индуцированную посредством перекрестного связывания с экспрессирующими PD-L1 клетками посредством биспецифического антитела и посредством блокирования взаимодействия PD-L1:PD-1, измеряют в качестве пролиферации Т-клеток.

PBMC получали из лейкоцитарной пленки от здорового донора (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) с использованием градиента фикола (Lonza, среда для разделения лимфоцитов, кат. no. 17-829E). PBMC метили с использованием 0,5 мкМ сукцинимидилового сложного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) (Life technologies, кат. no. C34554) в PBS, в соответствии с инструкциями производителя. 75000 меченных CFSE PBMC рассеивали на лунку в 96-луночный круглодонный планшет (Greiner bio-one, кат. no. 650180) и инкубировали с субоптимальной концентрацией антитела против CD3 (Stemcell, клон UCNT1, кат. no. 60011; 0,03 мкг/мл конечная концентрация), которая, как предварительно определено, индуцировала субоптимальную пролиферацию Т-клеток, и биспецифическими или контрольными антителами (0,0032-10 мкг/мл), в 200 мкл IMDM GlutaMAX, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ и 1% пенициллином/стрептомицином, при 37°C, 5% CO₂, в течение четверых суток.

Пролиферацию различных подгрупп Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии. Клетки промывали в PBS и окрашивали для исключения мертвых клеток с использованием красителя для определения жизнеспособности Fixable Viability Stain 510 (50 мкл/лунку; BD Biosciences, кат. no. 564406) при 4°C в течение 20 мин. После другой промывки в буфере для FACS, клетки окрашивали, чтобы различать различные клеточные подтипы, с использованием конъюгированного с PE-CF594 специфического для CD56 антитела (BD BioSciences, кат. no. 564849), конъюгированного с Pacific Blue специфического для CD4 антитела (BioLegend, кат. no. 300521), конъюгированного с AF700 специфического для CD8 антитела (BioLegend, кат. no. 301028), конъюгированного с BV711 специфического для CD197 антитела (CCR7; BioLegend, кат. no. 353228), конъюгированного с PE-Cy7 специфического для CD45RO антитела (BioLegend, кат. no. 304230), конъюгированного с APC специфического для CD274 антитела (PD-L1; BioLegend кат. no. 329708) и конъюгированного с BV605 специфического для CD137 антитела (BioLegend, кат. no. 309822) в

буфере для FACS при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали три раза в буфере для FACS и затем измеряли в устройстве FACS Fortessa (BD Biosciences) в 80 мкл буфера для FACS. Разведение CFSE измеряли в тотальных Т-клетках и в различных подгруппах Т-клеток (например, CCR7⁺CD45RO⁺ Т-клетках центральной памяти и эффекторных CCR7⁺CD45RO⁺ Т-клетках памяти). Подробные анализы пролиферации Т-клеток на основании пиков CFSE, указывающие на деления клеток, выполняли посредством программного обеспечения FlowJo 10.4, и экспортированные значения индекса размножения использовали для построения кривых зависимости ответа от дозы в GraphPad Prism версии 6.04 (GraphPad Software, Inc). Индекс размножения определяет кратность размножения общей культуры; индекс размножения 2,0 представляет удвоение количества клеток, в то время как индекс размножения 1,0 представляет отсутствие изменения общего количества клеток.

На фигуре 4А показано, что биспецифическое антитело GEN1046 индуцировало размножение Т-клеток, которое было увеличено, по сравнению только с предварительной стимуляцией CD3, антителом для контроля изотипа b12-FEAL и одновалентным контрольным антителом против PD-L1-, PD-L1-547-FEALxb12-FEAR, имеющим одно не относящееся к делу плечо, и одно, соответствующее исходному двухвалентному антителу PD-L1-547-FEAR. Индуцированная GEN1046 пролиферация Т-клеток являлась наиболее оптимальной при 0,4 мкг/мл, в то время как при более низких и более высоких концентрациях индуцированное GEN1046 размножение Т-клеток являлось менее выраженным. Когда CCR7⁺CD45RO⁺ Т-клетки центральной памяти и эффекторные CCR7⁺CD45RO⁺ Т-клетки памяти анализировали по отдельности (фигура 4В), возникал сходный паттерн, в котором GEN1046 усиливал пролиферацию Т-клеток, которая являлась оптимальной при 0,4 мкг/мл.

Пример 8: Анализ антигенспецифической пролиферации CD8⁺ Т-клеток для измерения эффектов связывания биспецифических антител с PD-L1 и CD137

Для измерения индукции пролиферации Т-клеток посредством биспецифического антитела, нацеленного на PD-L1 и CD137, в антигенспецифическом анализе, дендритные клетки (DC) трансфицировали с использованием транскрибированной *in vitro* РНК (IVT-РНК) клаудина-6 для экспрессии антигена клаудина-6. Т-клетки трансфицировали с использованием IVT-РНК PD-1 и с использованием специфического для клаудина-6, рестрицированного по HLA-A2 Т-клеточного рецептора (TCR). Этот TCR может узнавать происходящий из клаудина-6 эпитоп, представленный посредством HLA-A2 на DC. Биспецифическое антитело PD-L1xCD137 GEN1046 может перекрестно связывать PD-L1, эндогенно экспрессированный на дендритных клетках моноцитарного происхождения или на клетках опухолей, и CD137 на Т-клетках, приводя к ингибированию ингибирующего взаимодействия PD-1/PD-L1 и, в то же самое время, к кластеризации CD137, приводящей к пролиферации Т-клеток. Кластеризация рецептора CD137, экспрессированного на Т-клетках, приводит к активации рецептора CD137, который, таким образом, подает костимулирующий сигнал Т-клетке.

HLA-A2⁺ мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали от здоровых доноров (Transfusionszentrale, University Hospital, Mainz, Germany). Моноциты выделяли из PBMC посредством технологии активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) с использованием микробусин против CD14 (Miltenyi; кат. no. 130-050-201), в соответствии с инструкциями производителя. Лимфоциты периферической крови (PBL, отрицательная по CD14 фракция) замораживали для будущего выделения Т-клеток. Для дифференцировки в незрелые DC (iDC), 1x10⁶ моноцитов/мл культивировали в течение пяти суток в RPMI GlutaMAX (Life technologies GmbH, кат. no. 61870-044), содержащей 5% человеческой сыворотки АВ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, кат. no. H4522-100ML), пируват натрия (Life technologies

GmbH, кат. по. 11360-039), заменимые аминокислоты (Life technologies GmbH, кат. по. 11140-035), 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина (Life technologies GmbH, кат. по. 15140-122), 1000 МЕ/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF; Miltenyi, кат. по. 130-093-868) и 1000 МЕ/мл интерлейкина-4 (IL-4; Miltenyi, кат. по. 130-093-924). Один раз в течение этих пяти суток, половину среды заменяли на свежую среду. iDC собирали посредством сбора неадгерентных клеток, и адгерентные клетки открепляли посредством инкубации с PBS, содержащим 2 мМ ЭДТА, в течение 10 мин при 37°. После промывки, iDC замораживали в RPMI GlutaMAX, содержащей 10% об./об. DMSO (AppliChem GmbH, кат. по. A3672,0050)+50% об./об. человеческой сыворотки АВ, для будущих антигенспецифических анализов Т-клеток.

За сутки до начала анализа антигенспецифической пролиферации CD8⁺ Т-клеток, замороженные PBL и iDC от одного и того же донора размораживали. CD8⁺ Т-клетки выделяли из PBL посредством технологии MACS с использованием микробусин против CD8 (Miltenyi, кат. по. 130-045-201), в соответствии с инструкциями производителя. Около 10-15×10⁶ CD8⁺ Т-клеток подвергали электропорации с использованием 10 мкг транслированной *in vitro* (IVT) РНК, кодирующей альфа-цепь, плюс 10 мкг IVT-РНК, кодирующей бета-цепь специфического для клаудина-6 мышшиного TCR (рестрицированного по HLA-A2; раскрытого в WO 2015150327 A1) плюс 0,4-10 мкг IVT-РНК, кодирующей PD-1, в 250 мкл X-Vivo15 (Biozym Scientific GmbH, кат. по.881026) в 4-мм кювете для электропорации (VWR International GmbH, кат. по. 732-0023) с использованием системы устройства для электропорации BTX ECM® 830 (BTX; 500 В, импульс 1×3 мс). Немедленно после электропорации, клетки переносили в свежую среду IMDM (Life Technologies GmbH, кат. по. 12440-061), дополненную 5% человеческой сывороткой АВ, и оставляли в покое при 37°C, 5% CO₂, по меньшей мере на 1 час. Т-клетки метили с использованием 1,6 мкМ сукцинимидилового сложного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE; Invitrogen, кат. по. C34564) в PBS в соответствии с инструкциями производителя, и инкубировали в среде IMDM, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, O/N.

Вплоть до 5×10⁶ размороженных iDC подвергали электропорации с использованием 0,3-1 мкг IVT-РНК, кодирующей полноразмерный клаудин-6, в 250 мкл среды X-Vivo15, с использованием системы для электропорации, как раскрыто выше (300 В, импульс 1×12 мс) и инкубировали в среде IMDM, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, O/N.

На следующие сутки, клетки собирали. Экспрессию на поверхности клеток клаудина-6 и PD-L1 на DC, и TCR и PD-1 на Т-клетках проверяли посредством проточной цитометрии. DC окрашивали с использованием конъюгированного с Alexa647 специфического для CLDN6 антитела (недоступного из коммерческих источников; собственного производства) и с использованием антитела против CD274 человека (PD-L1, eBiosciences, кат. по. 12-5983), и Т-клетки окрашивали с использованием антитела против β-цепи мышшиного TCR (Becton Dickinson GmbH, кат. по. 553174) и с использованием антитела против CD279 человека (PD-1, eBiosciences, кат. по. 17-2799). 5000 подвергнутых электропорации DC инкубировали с 50000 подвергнутых электропорации, меченных CFSE Т-клеток в присутствии биспецифических или контрольных антител в IMDM GlutaMAX, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, в 96-луночном круглодонном планшете. Пролиферацию Т-клеток измеряли через 5 суток посредством проточной цитометрии. Подробные анализы пролиферации Т-клеток на основании пиков CFSE, указывающие на деления клеток, выполняли посредством программного обеспечения FlowJo 10.4, и экспортированные значения индекса размножения использовали для построения кривых зависимости ответа от дозы в GraphPad Prism версии 6.04 (GraphPad Software, Inc). Индекс размножения определяет кратность размножения общей культуры; индекс

размножения 2,0 представляет удвоение количества клеток, в то время как индекс размножения 1,0 представляет отсутствие изменения общего количества клеток.

На фигуре 5 показано, что GEN1046 зависимым от дозы образом усиливал пролиферацию Т-клеток, по сравнению с антителом для контроля изотипа b12-FEAL, что отражено посредством увеличения индекса размножения при концентрациях $\geq 0,004$ мкг/мл. Индуцированная GEN1046 пролиферация Т-клеток являлась наиболее оптимальной при 0,03-0,11 мкг/мл, и немного увеличивалась при наивысших протестированных концентрациях, что является показательным для колоколообразной кривой зависимости ответа от дозы.

Пример 9: Антигенспецифический анализ пролиферации CD8⁺ Т-клеток для измерения высвобождения цитокинов, индуцированного посредством биспецифических антител, связывающих PD-L1 и CD137

Индукцию высвобождения цитокинов посредством биспецифического антитела GEN1046, нацеленного на PD-L1 и CD137, измеряли в антигенспецифическом анализе, проводимом в основном, как раскрыто в примере 8.

Т-клетки подвергали электропорации с использованием 10 мкг РНК, кодирующей α -цепь и 10 мкг РНК, кодирующей β -цепь TCR, в присутствии или в отсутствие 2 мкг кодирующей PD-1 IVT РНК. Подвергнутые электропорации Т-клетки не подвергали мечению CFSE (как раскрыто выше), но переносили в свежую среду IMDM (Life Technologies GmbH, кат. по. 12440-061), дополненную 5% человеческой сывороткой АВ, и немедленно после электропорации. iDC подвергали электропорации с использованием 5 мкг РНК, кодирующей клаудин-6 (CLDN6), как раскрыто выше. После инкубации O/N, DC окрашивали с использованием конъюгированного с Alexa647 специфического для CLDN6 антитела, и Т-клетки - с использованием антитела против β -цепи TCR мыши и с использованием антитела против CD279 человека, как раскрыто выше.

5000 подвергнутых электропорации DC инкубировали с 50000 подвергнутых электропорации Т-клеток в присутствии различных концентраций биспецифического антитела GEN1046 или контрольного антитела b12-FEAL в IMDM GlutaMAX, дополненной 5% человеческой сывороткой АВ, в 96-луночном круглодонном планшете. После 48-часового периода инкубации, планшеты центрифугировали при 500 x g в течение 5 мин, и супернатант осторожно переносили из каждой лунки в новый 96-луночный круглодонный планшет и хранили при 80°C до анализа цитокинов на платформе MSD[®]. Собранные супернатанты из анализа антигенспецифической пролиферации анализировали по уровням цитокинов для 10 различных цитокинов с использованием 10-плексного набора для анализа провоспалительной панели 1 человека MSD V-Plex (10-Plex) (Meso Scale Diagnostics, LLC., кат. по. K15049D-2) в устройстве MESO QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Diagnostics, LLC., кат. по. R31QQ-3), в соответствии с инструкциями производителя.

Добавление GEN1046 приводило к зависимому от дозы увеличению секреции в первую очередь IFN- γ , TNF- α , IL-13 и IL-8 (фигура 6), которое являлось наиболее оптимальным при концентрациях 0,04-0,33 мкг/мл. Более низкие уровни дозы, так же как более высокий уровень дозы 1 мкг/мл, являлись менее эффективными для индукции этих цитокинов, что является показательным для колоколообразной кривой зависимости ответа от дозы. При сравнении совместных культур Т-клеток:DC, в которых Т-клетки не подвергали электропорации с использованием РНК PD-1, с культурами, в которых Т-клетки подвергали электропорации с использованием 2 мкг РНК PD-1, немного более высокие уровни цитокинов подвергались детекции для совместных культур в отсутствие электропорации РНК PD-1. Это наблюдали для кривой зависимости ответа от дозы GEN1046, так же как для значений для контрольного антитела b12-FEAL.

Пример 10: Анализ размножения *ex vivo* TIL для оценки эффектов биспецифического антитела CD137xPD-L1 на инфильтрующие опухоль лимфоциты.

Для оценки эффектов CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR на инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), культивирование *ex vivo* ткани опухоли человека проводили следующим образом. Свежие образцы после резекции ткани опухоли человека промывали три раза посредством переноса выделенных фрагментов из одной лунки в 6-луночную планшете (Fisher Scientific кат. no. 10110151), содержащем среду для промывки, в следующую с использованием шпателя или серологической пипетки. Среда для промывки состояла из X-VIVO 15 (Biolyum, кат. no. 881024), дополненной 1% пен./стрепт. (Thermo Fisher, кат. no. 15140-122) и 1% фунгилона (Thermo Fisher, кат. no. 15290-026). Затем, опухоль рассекали с использованием хирургического ножа (Braun/Roth, кат. no. 5518091 BA223) и нарезали на фрагменты диаметром около 1-2 мм. Два фрагмента каждой помещали в одну лунку 24-луночного планшета (VWR international, кат. no. 701605), содержащую 1 мл среды для TIL (X-VIVO 15, 10% человеческий сывороточный альбумин (HSA, CSL Behring, кат. no. PZN-6446518) 1% пен./стрепт., 1% фунгилон, и дополненную 10 ед./мл IL-2 (Proleukin®S, Novartis Pharma, кат. no. 02238131)). CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR добавляли в указанных конечных концентрациях. Культуральные планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 72 часа, 1 мл свежей среды для TIL, содержащей указанную концентрацию биспецифического антитела, добавляли в каждую лунку. Лунки мониторировали посредством микроскопа по возникновению кластеров TIL каждые вторые сутки. Лунки переносили индивидуально, когда более чем 25 микрокластеров TIL детектировали в соответствующей лунке. Чтобы разделить кластеры TIL, клетки в лунках 24-луночного планшета ресуспендировали в 2 мл среды и переносили в лунку 6-луночного планшета. Каждую лунку, кроме того, дополняли другими 2 мл среды для TIL.

После суммарного периода культивирования 10-14 суток, TIL собирали и анализировали посредством проточной цитометрии. Клетки окрашивали с использованием следующих реагентов, всех разведенных 1:50 в-буфере для окрашивания, (D-PBS, содержащем 5% FCS и 5 мМ ЭДТА), антитело-FITC против CD4 человека (Miltenyi Biotec, кат. no. 130-080-501), антитело-PE-Cy7 против CD3 человека (BD Pharmingen, кат. no. 563423), 7-аминоактиномицин D (7-AAD, Beckman Coulter, кат. no. A07704), антитело-APC против CD56 человека (eBioscience, кат. no. 17-0567-42) и антитело-PE против CD8 человека (TONBO, кат. no. 50-0088). Чтобы обеспечивать количественное сравнение полученных клеток между различными группами лечения, осадки клеток ресуспендировали после последней стадии промывки в буфере для FACS, дополненном бусинами BD™ CompBeads (BD biosciences, кат. no. 51-90-9001291). Проточный цитометрический анализ проводили в проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson), и полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 7.6.5. Относительное количество жизнеспособных TIL, количество CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, количество CD3⁺CD4⁺ Т-клеток и количество CD3⁺CD56⁺ NK-клеток на 1000 бусин, коррелирующие с соответствующей лункой в 6-луночном планшете, рассчитывали посредством нормализации полученной фракции отрицательных по 7AAD клеток по полученным количествам бусин.

На фигуре 7 показан анализ размножения TIL из образца ткани немелкоклеточной карциномы легкого человека. В данном случае, добавляли следующие концентрации CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR: 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл, образец ткани от того же самого пациента без добавления антитела служил в качестве отрицательного контроля. Через 10 суток культивирования, TIL собирали и анализировали посредством проточной цитометрии. Измеряли пять образцов (из 5 исходных лунок) для каждой концентрации антитела, полученные из различных лунок 24-луночного планшета. Во всех образцах,

культивированных с биспецифическим антителом, количество жизнеспособных TIL увеличивалось, по сравнению с контрольными образцами без антитела. В общем, значительное (вплоть до 10-кратного) размножение жизнеспособных TIL наблюдали, когда 0,1 мкг/мл CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR добавляли к культурам (фигура 7A). При анализе по отдельности, наблюдали сильный эффект на размножение CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, который являлся значимыми при 0,1 мкг/мл CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR (фигура 7B; 7,4-кратное размножение, по сравнению с контролем). CD3⁺CD4⁺ Т-клетки размножались только слабо, и их размножение не являлось значимым, по сравнению с культурами без антитела (фигура 7C). Наиболее выраженное размножение TIL наблюдали для CD3⁺CD56⁺ NK-клеток (фигура 7D; вплоть до 64-кратного размножения, по сравнению с контролем), которое являлось значимым при 0,1 мкг/мл CD137-009-FEALxPD-L1-547-FEAR.

Пример 11: Фармакодинамическая оценка GEN1046 в периферической крови у пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях.

Для исследования биологической активности GEN1046 при различных уровнях дозирования у пациентов с находящимися на поздних стадиях опухолями, образцы крови и сыворотки собирали в исходной точке и в множественных временных точках при лечении. На основании механизма действия GEN1046, предположили, что уровни дозирования с биологической активностью могут модулировать уровни циркулирующего интерферона- γ (IFN- γ) и индуцируемого интерфероном-гамма белка 10 (IP-10) и индуцировать пролиферацию периферических CD8 Т-клеток.

Для определения уровней в сыворотке (IFN- γ) и IP-10, образцы сыворотки собирали от пациентов в исходной точке и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (сутки 1 [через 2 час и между 4 и 6 час после введения], 2, 3, 8 и 15). Уровни в сыворотке IFN- γ и IP-10 измеряли посредством мультиплексного иммуноанализа Meso Scale Discovery (MSD) (кат. по. K15209G), следуя инструкциями производителя.

Для измерения периферической модуляции подгрупп иммуноцитов, иммунофенотипирование периферической крови проводили в цельной крови, собранной в пробирки с ЭДТА в исходной точке и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (суток 2, 3, 8 и 15). 100 мкл цельной крови добавляли к конъюгированным с флуорохромом моноклональным антителам, которые специфически связываются с антигенами поверхности клеток: CD45RA-FITC (клон LEU-18, BD Biosciences кат. по. 335039), CCR7-BV510 (клон 3D12, BD Biosciences, кат. по. 563449), CD8-PerCP-Cy5.5 (клон RPA-T8, BD Biosciences, кат. по. 560662). После инкубации на льду, окрашенные образцы обрабатывали лизирующим раствором для FACS (BD Biosciences, каталожный No 349202) для лизиса эритроцитов. Избыток антитела и клеточный дебрис удаляли посредством промывки буфером для окрашивания (BD Biosciences, кат. по. 554656). После лизиса/промывки, клетки фиксировали и пермеабелизовывали посредством инкубации с пермеабелизирующим буферным раствором 2 (BD Biosciences, кат. по. 340973). Затем клетки промывали и ресуспендировали в буфере для окрашивания и инкубировали на льду с антителом против Ki67 (BV421 B56, BD Biosciences, кат. по. 562899) для детекции пролиферирующих клеток. После инкубации, избыток антитела удаляли посредством промывки буфером для окрашивания. Клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания и получали данные в проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в течение 1 часа после окрашивания.

Введение GEN1046 пациентам с злокачественными опухолями приводило к модуляции уровней циркулирующих IFN- γ и IP-10, и пролиферации эффекторных CD8 Т-клеток памяти (таблица 9 и фигура 13). В предварительном наборе данных, показанном в таблице 9, уровни IFN- γ увеличивались более чем в 2 раза

в первом цикле лечения среди всех тестируемых уровней дозы. Максимальные увеличения детектированы при уровнях дозы 50 мг и 80 мг, и большинство из пациентов в когорте 80 мг (75%) имели кратность увеличения >2 (Таблица 9). GEN1046 также вызывал пролиферацию эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти, как измерено посредством увеличения частоты Ki67⁺ CD8⁺ CD45RA⁻CCR7⁻ Т-клеток. Сравнимо с изменениями, наблюдаемыми с использованием модуляции уровней циркулирующего IFN γ , максимальную и более согласованную модуляцию пролиферирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти наблюдали у пациентов в когорте 80 мг. В частности, в когорте 400 мг амплитуды изменений уровней как циркулирующего IFN- γ , так и пролиферирующих эффекторных CD8 Т-клеток памяти, были ниже, по сравнению с когортами 25-200 мг. Эти результаты показали, что GEN1046 вызывал иммунный ответ, характеризующийся модуляцией иммунных эффекторных клеток и растворимых факторов, критических для получения противоопухолевых иммунных ответов, с ответами с большей амплитудой при уровне дозы 80 мг.

В наборе данных, показанном на фигуре 13, увеличение уровней IFN- γ и IP-10 наблюдали в первом цикле лечения при уровнях дозы \leq 200 мг (фигура 13A-B). Хотя увеличение уровней IFN- γ и IP-10 наблюдали также при уровнях дозы \geq 400 мг, максимальная кратность изменения от исходного в ходе первого цикла лечения была значимо ниже, по сравнению с более низкими уровнями дозы. GEN1046 также вызывал пролиферация тотальных CD8⁺ Т-клеток и эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти, как измерено по увеличению частоты Ki67⁺ CD8⁺ Т-клеток и Ki67⁺ CD8⁺ CD45RA⁻CCR7⁻ Т-клеток (фигура 13C-D). Сравнимо с изменениями, наблюдаемыми с использованием модуляции уровней циркулирующих IFN γ и IP-10, максимальную и более согласованную модуляцию пролиферирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти наблюдали у пациентов, подвергнутых лечению с использованием уровней дозы \leq 200 мг, в когортах \geq 400 мг, амплитуды изменений пролиферирующих эффекторных CD8 Т-клеток памяти и тотальных CD8 Т-клеток были значимо ниже, по сравнению с когортами 25-200 мг. Эти результаты показали, что GEN1046 вызывал иммунный ответ, характеризующийся модуляцией иммунных эффекторных клеток и растворимых факторов, критических для получения противоопухолевых иммунных ответов, с ответами с большей амплитудой при уровнях дозы \leq 200 мг

Таблица 9. GEN1046 Модуляция периферических фармакодинамических конечных точек у пациентов с раками: Пиковая кратность изменения от исходного в ходе цикла 1, в зависимости от уровня дозы^a

	GEN1046 25 мг	GEN1046 50 мг	GEN1046 80 мг	GEN1046 200 мг	GEN1046 400 мг
Интерферон-γ^b					
n	4	4	8	8	6
Мин.	1,17	1,06	1,45	1,47	1,18
Q1	2,05	1,89	2,82	2,35	1,32
Медиана	3,90	4,63	4,49	3,48	2,56
Q3	9,99	6,90	5,94	4,89	3,37
Макс.	15,11	7,27	12,17	5,20	102,08
Проллиферирующие эффекторные CD8 Т-клетки памяти^c					
n	3	2	8	8	7
Мин.	2,00	2,00	1,00	0,67	1,00
Q1	2,00	2,00	2,00	1,40	1,06

	GEN1046 25 мг	GEN1046 50 мг	GEN1046 80 мг	GEN1046 200 мг	GEN1046 400 мг
Медиана	2,00	2,50	3,42	2,83	1,50
Q3	3,50	3,00	9,75	5,25	2,00
Макс.	5,00	3,00	31,40	6,67	7,00

Предварительные данные на 27 января 2020 г.

n: количество пациентов на когорту дозы; Мин.: самое низкое измеренное значение; Q1: 25-й процентиль; Q3: 75-й процентиль; Макс.: Максимальное измеренное значение.

^a Фармакодинамические оценки, включая изменения уровней циркулирующего интерферона-гамма и эффекторных Т-клеток памяти, проводили с использованием образцов крови от пациентов с солидными опухолями на поздних стадиях, зарегистрированных в фазу повышения дозы открытого, многоцентрового исследования безопасности GEN1046 (NCT03917381).

^b Уровни циркулирующего интерферона-гамма измеряли в образцах сыворотки в исходной точке, и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (сутки 1 [через 2 час и между 4 и 6 час после введения], 2, 3, 8 и 15). Уровни интерферона-гамма в образцах сыворотки определяли посредством мультиплексного иммунного анализа Meso Scale Discovery (MSD).

^c Иммунофенотипирование периферической крови проводили в цельной крови, собранной в исходной точке и в множественных временных точках после введения GEN1046 в цикле 1 и цикле 2 (сутки 2, 3, 8 и 15). Частоту пролиферирующих (Ki67⁺) эффекторных CD8 Т-клеток памяти (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻ Т-клеток) оценивали в образцах цельной крови посредством проточной цитометрии.

Пример 12: Предварительные данные клинического исследования

Дизайн исследования:

Клиническое исследование GCT1046-01 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03917381) разработано как исследование из двух частей, включающее текущую часть повышения дозы и запланированную часть расширения.

Исследование разработано как открытое, многоцентровое исследование безопасности GEN1046 (DuoBody®-PD-L1x4-1BB) фазы I/IIa. Исследование состоит из 2 частей; впервые проводимое с участием людей (FHN) повышение дозы (фаза I) и расширение (фаза IIa). На фигуре 8 показано схематическое представление дизайна клинического исследования.

Повышение дозы

Повышение дозы разработано для оценки GEN1046 у субъектов с солидными злокачественными опухолями для определения максимально переносимой дозы (MTD) или максимальной вводимой дозы (MAD), и/или рекомендованной для фазы 2 дозы (RP2D).

Для повышения дозы, субъект должен был представлять собой мужчину или женщину в возрасте \geq 18 лет и должен был иметь поддающееся измерению заболевание, в соответствии с RECIST 1.1.

Субъекты должны были иметь гистологически или цитологически подтвержденную не относящуюся к ЦНС солидную опухоль, которая являлась метастазирующей или неоперабельной, и представлять собой тех, для которых не было доступной стандартной терапии, вероятно, обеспечивающей клиническое преимущество, или субъектов, которые не являются кандидатами для такой доступной терапии, и для которых, по мнению исследователя, экспериментальная терапия с использованием GEN1046 может обеспечивать преимущество.

В повышении дозы, субъектам вводили одну инфузию GEN1046 каждую третью неделю (1Q3W), до соответствия определенным протоколом критериям прекращения лечения; например, радиографическому

прогрессированию или клиническому прогрессированию заболевания. GEN1046 вводили с использованием i.v. инфузии в течение минимум 60 минут на сутки 1 из каждого 3-недельного цикла лечения (21 сутки). Концепция дизайна исследования показана на фигуре 8.

1Q3W повышение дозы разработано для потенциальной (в зависимости от данных, собранных в ходе исследования) оценки GEN1046 при 7 основных уровнях дозы: фиксированных 25, 80, 200, 400, 800, 1200 и 1600 мг, и 6 необязательных промежуточных уровнях дозы, фиксированных 50, 140, 300, 600, 1000 и 1400 мг.

Рекомендованная для фазы 2 доза (RP2D) была основана на обзоре доступной информации о безопасности и дозировании и может быть ниже максимально переносимой дозы (MTD).

Расширение

Целью расширения является предоставление дополнительных данных о безопасности, переносимости, MoA, PK и противоопухолевой активности выбранных дозы/расписания.

Расширение разработано для регистрации для вплоть до 6 типов опухолей (7 параллельных когорт), т.е., для NSCLC, EC, UC, TNBC, SCCHN и рака шейки матки. Дополнительные когорты расширения для дополнительных типов опухолей можно открывать, на основании предварительных сигналов эффективности, полученных при повышении дозы. Спонсор может определять приоритет открытия специфических для заболеваний когорт расширения, на основании данных, полученных при повышении дозы.

Когорты расширения для NSCLC

Когорты расширения для NSCLC должны включать субъектов с плоскоклеточной гистологией, так же как субъектов с неплоскоклеточной гистологией.

Поскольку частоты ответа и другие связанные с заболеванием исходы могут отличаться в наивной по отношению к PD-1/PD-L1 популяции, по сравнению с подвергнутой лечению, применительно к PD-1/L1, популяцией, пациентов с NSCLC разделяли на различные когорты для обеспечения достаточного доказательства предварительной эффективности. Целью когорты 2 является исследование предварительной эффективности у наивных по отношению к PD-1/L1 пациентов с NSCLC, когда SOC с использованием ингибиторов PD-1/L1 является ограниченным или недоступным. Если предварительное клиническое доказательство позволяет предполагать значительное улучшение, по сравнению с доступными видами терапии в популяции с сильно неудовлетворенными медицинскими нуждами (например, низкой или отрицательной по PD-L1), как определено посредством обзора DMC совокупности данных, спонсор может запросить открытие когорты 2 в регионах, в которых доступ к ингибиторам PD-1/L1 не является ограниченным.

Когорта расширения для UC

Когорта UC разработана для включения как субъектов, являющихся подходящими для подвергания химиотерапии на основе платины, так и субъектов, не являющихся подходящими для подвергания химиотерапии на основе платины.

Когорты расширения для SCCHN и TNBC

Когорты SCCHN и TNBC могут включать как субъектов, подвергнутых предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/PD-L1, так и субъектов, не подвергнутых предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1.

Критерии включения

Субъекты являются подходящими для включения в исследование, только если применимы все из следующих критериев:

Субъект должен представлять собой субъекта - мужчину или женщину в возрасте ≥ 18 лет, и должен иметь поддающееся измерению заболевание, в соответствии с RECIST 1.1.

Субъекты должны иметь гистологически или цитологически подтвержденный диагноз рецидивирующего или невосприимчивого, находящегося на поздних стадиях и/или метастазирующего NSCLC, EC, UC, TNBC, SCCHN или рака шейки матки, представлять собой субъектов, которые больше не являются кандидатами для или отказываются от стандартной терапии (если субъекты имели доступ к соответствующим видам лечения и являлись подходящими для них), и которые претерпели неудачу противораковой терапии, следующим образом:

Когорта расширения 1 (NSCLC): подвергнутые лечению, применительно к PD-1/L1

Субъекты с NSCLC, которых подвергали воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения) против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты должны иметь гистологический или цитологический диагноз неплоскоклеточный NSCLC, который не имеет сенсibiliзирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации при анапластической лимфоме (ALK)/реаранжировки ROS1. Сенсibiliзирующие мутации EGFR представляют собой те мутации, которые являются подходящими для лечения с использованием одобренного ингибитора тирозинкиназы (TKI). Документация статуса EGFR и ALK должна являться доступной для локальной оценки. Если документация статуса EGFR и ALK является недоступной, одобрение назначенного спонсором медицинского наблюдателя необходимо до регистрации.

Субъектов должны были подвергать терапии на основе платины (или альтернативной химиотерапии из-за того, что для них не подходит платина, например, включающего гемцитабин режима).

Субъекты должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1, отдельно или в комбинации, и должны иметь радиографическое прогрессирование заболевания при лечении. Одобрение спонсора является необходимым для субъектов с BOR SD или PD при включающем CPI режиме с длительностью лечения вплоть до 16 недель.

Когорта расширения 2 (NSCLC) - наивные по отношению к PD-1/L1

Субъекты с NSCLC, которых подвергали воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения) против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты должны иметь гистологический или цитологический диагноз неплоскоклеточный NSCLC, который не имеет сенсibiliзирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации киназы анапластической лимфомы (ALK)/реаранжировки ROS1. Сенсibiliзирующие мутации EGFR представляют собой те мутации, которые являются подходящими для лечения с использованием одобренного ингибитора тирозинкиназы (TKI). Документация статуса EGFR и ALK должна являться доступной для локальной оценки. Если документация статуса EGFR и ALK является недоступной, одобрение назначенного спонсором медицинского наблюдателя необходимо до регистрации.

Субъектов должны были подвергать терапии на основе платины (или альтернативной химиотерапии, из-за того, что для них не подходит платина, например, включающего гемцитабин режима).

Субъекты не должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1.

Когорта расширения 3 (UC):

Субъекты с UC (мочевого пузыря, мочеточника, мочеиспускательного канала или почечной лоханки), которых подвергали воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения) против местнораспространенного/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1, отдельно или в комбинации, и должны иметь радиографическое прогрессирование заболевания при лечении. Одобрение спонсора является необходимым для субъектов с BOR SD или PD при включающем CPI режиме с длительностью лечения лечение вплоть до 16 недель.

Локальные результаты наиболее недавнего теста PD-L1 должны быть представлены до регистрации (если доступно).

Когорта 3a: Для субъектов, подходящих для подвергания терапии на основе платины:

Субъекты должны были быть подвергнуты химиотерапии на основе платины.

Когорта 3b: Для субъектов, неподходящих для подвергания терапии на основе платины:

Субъекты должны являться неподходящими для любой химиотерапии на основе платины или любой включающей цисплатин химиотерапии.

Когорта расширения 4 (EC):

Субъекты с EC, которых подвергали воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения) против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты должны иметь гистологию эпителия эндометрия, включающую: эндометриоидную, серозную, плоскоклеточную, светлоклеточную карциному, или карциносаркому. Саркомы и мезенхимальный EC исключены.

Субъекты не должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1 (необходимо соблюдать установленные локальные инструкции по применению/доступ).

Когорта расширения 5 (TNBC):

TNBC, определенный как отрицательный по анализу HER2 [HER2 является отрицательным по FISH] (не характерное для амплификации соотношение HER2 к CEP17 < 2,0 среднее количество копий гена HER2 для одиночного зонда < 4 сигналов/клетку), или альтернативно, результат экспрессии белка HER2 по ИHC представляет собой 1+ отрицательный или ИHC 0 – отрицательный, и отрицательный статус ER и PgR (определенный как < 1% клеток, экспрессирующих рецепторы гормонов, по анализу ИHC), по локальной оценке. Субъекты, подвергнутые воздействию по меньшей мере одного, но не более чем 4 предшествующих системных режимов лечения, включая, но без ограничения, режимы, включающие антрациклин, таксан, антимаболит или ингибитор образования микротрубочек (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения) против местнораспространенного/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты с предшествующим анамнезом рака молочной железы с различным фенотипом должны иметь подтверждение TNBC по биопсии, полученной после последней предшествующей системной терапии субъекта.

Когорта 5a – Субъекты, подвергнутые предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1:

Субъекты должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1, отдельно или в комбинации, и должны иметь радиографическое прогрессирование заболевания при лечении.

Когорта 5b – Субъекты, не подвергнутые предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1:

Субъекты не должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1.

Когорта расширения 6 (SCCHN):

Субъекты с рецидивирующей или метастазирующей SCCHN (полости рта, глотки, гортани), которых подвергали воздействию вплоть до 4 предшествующих системных режимов лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания, с радиографическим PD во время или после последнего предшествующего лечения (вспомогательное и поддерживающее лечение считают частью одной линии лечения).

Субъекты должны иметь прогрессирование заболевания во время или после предшествующей терапии с использованием химиотерапии на основе платины (альтернативная комбинированная химиотерапия является приемлемой, если документирован статус субъекта, как неподходящего для лечения с использованием платины).

Когорта 6a – Субъекты, подвергнутые предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1:

Субъекты должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1, отдельно или в комбинации, и должны иметь радиографическое прогрессирование заболевания при лечении. Одобрение спонсора является необходимым для субъектов с BOR SD или PD при включающем CPI режиме с длительностью лечения лечение вплоть до 16 недель.

Когорта 6b – Субъекты, не подвергнутые предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1:

Субъекты не должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1.

Когорта расширения 7 (Рак шейки матки):

Субъекты с раком шейки матки, подвергнутые воздействию по меньшей мере одного, но не более чем 4 предшествующих системных режимов лечения, включая химиотерапию в комбинации с бевацизумабом (в соответствии с применимой инструкцией), если субъект не является неподходящим для бевацизумаба, в соответствии с местными стандартами (химиотерапию, проведенную в адьювантных или неoadьювантных условиях, или в комбинации с радиотерапией, не следует считать предшествующей линией терапии) против рецидивирующего/метастазирующего заболевания, с радиографическим прогрессированием заболевания во время или после последнего предшествующего лечения.

Субъекты должны иметь рак шейки матки плоскоклеточной, аденокарциномной или аденосквамозной гистологии.

Субъекты не должны были быть подвергнуты предшествующему лечению с использованием ингибитора PD-1/L1 (необходимо соблюдать установленные локальные инструкции по применению/доступ).

Результаты

Повышение дозы

Следующие предварительные результаты получены во время повышения дозы. В таблице 10 показан наилучший общий ответ (RECIST v1.1), в зависимости от уровня дозы, при регистрации и дозировании всего для 30 пациентов (дата вывода данных: 03 февраля 2020 г.).

В таблицах 11 и 12 показана частота объективных ответов и подтвержденная частота объективных ответов, соответственно (RECIST v1.1), в зависимости от уровня дозы при регистрации и дозировании всего для 61 пациентов (прекращение сбора данных: 12 октября 2020 г.).

Наилучший процент изменения от исходного размера опухоли у всех пациентов показан на фигуре 9. Контроль заболевания наступал у 40/61 (65,6%) пациентов в фазе повышения дозы. Частичный ответ (PR) достигнут у четырех пациентов с трижды отрицательным раком молочной железы, раком яичника или немелкоклеточным раком легкого (NSCLC); у 36 пациентов сохранялось стабильное заболевание.

Клиническая активность, наблюдаемая у пациентов с NSCLC (наилучшее изменение от исходного размера опухоли), показана на фигуре 10 (прекращение сбора данных: 12 октября 2020 г.). Из шести пациентов с NSCLC, всех из которых подвергали предшествующей иммунотерапии против контрольных точек, два достигли неподтвержденного PR, у двух сохранялось стабильное заболевание, и два испытывали прогрессирующее заболевание.

Таблица 10: наилучший общий ответ (RECIST v1.1), в зависимости от уровня дозы.

	25 мг (n=2)	50 мг (n=5)	80 мг (n=8)	140 мг (n=1)	200 мг (n=8)	400 мг (n=6)	Всего (n=30)
Полный ответ	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Частичный ответ	0 (0)	0 (0)	2 ¹ (25)	0 (0)	1 ¹ (12,5)	0 (0)	3 (10)
Стабильное заболевание	0 (0)	3 (60)	5 (62,5)	0 (0)	5 (62,5)	6 (100)	19 (63,3)
Прогрессирующее заболевание	2 (100)	2 (40)	1 (12,5)	1 (100)	2 (25)	0 (0)	8 (26,6)
¹ uPR							

Таблица 11: Частота объективных ответов - повышение дозы

	Всего	25 мг	50 мг	80 мг	100 мг	140 мг	200 мг	400 мг	800 мг	1200 мг
N	61	4	5	9	6	6	9	9	9	4
Наилучший общий ответ										
CR (полный ответ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR (частичный ответ)	4 (6,6%)	0	0	2 (22,2%)	1 (16,7%)	0	1 (11,1%)	0	0	0
SD (стабильное заболевание)	36 (59,0%)	1 (25,0%)	3 (60,0%)	6 (66,7%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	5 (55,6%)	7 (77,8%)	5 (55,6%)	3 (75,0%)
PD (прогрессирующее заболевание)	14 (23,0%)	2 (50,0%)	2 (40,0%)	1 (11,1%)	0	2 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	1 (25,0%)
NE (не поддается оценке)	7 (11,5%)	1 (25,0%)	0	0	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (11,1%)	0	2 (22,2%)	0
Частота объективных ответов (CR+PR)	4 (6,6%)	0	0	2 (22,2%)	1 (16,7%)	0	1 (11,1%)	0	0	0
Частота контроля заболевания (PR+PR+SD)	40 (65,6%)	1 (25,0%)	3 (60,0%)	8 (88,9%)	4 (66,7%)	3 (50,0%)	6 (66,7%)	7 (77,8%)	5 (55,6%)	3 (75,0%)

Таблица 12: Частота подтвержденных ответов – повышение дозы

	Всего	25 мг	50 мг	80 мг	100 мг	140 мг	200 мг	400 мг	800 мг	1200 мг
N	61	4	5	9	6	6	9	9	9	4
Подтвержденный наилучший общий ответ										
CR (полный ответ)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR (частичный ответ)	2 (3,3%)	0	0	1 (11,1%)	1 (16,7%)	0	0	0	0	0
SD (стабильное заболевание)	38 (62,3%)	1 (25,0%)	3 (60,0%)	7 (77,8%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6 (66,7%)	7 (77,8%)	5 (55,6%)	3 (75,0%)
PD (прогрессирующее заболевание)	14 (23,0%)	2 (50,0%)	2 (40,0%)	1 (11,1%)	0	2 (33,3%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	2 (22,2%)	1 (25,0%)
NE (не поддается оценке)	7 (11,5%)	1 (25,0%)	0	0	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (11,1%)	0	2 (22,2%)	0
Частота подтвержденных объективных ответов (CR+PR)	2 (3,3%)	0	0	1 (11,1%)	1 (16,7%)	0	0	0	0	0
Частота подтвержденного контроля заболевания (PR+PR+SD)	40 (65,6%)	1 (25,0%)	3 (60,0%)	8 (88,9%)	4 (66,7%)	3 (50,0%)	6 (66,7%)	7 (77,8%)	5 (55,6%)	3 (75,0%)

Расширение:

Когорта расширения 1: На 12 октября 2020 г., 24 пациента были зарегистрированы в когорту расширения 1, которая включает пациентов с NSCLC (предварительно подвергнутых лечению, применительно к PD-1/L1). 12 пациентов могли быть оценены после исходной точки, с подтвержденным прогрессированием во время или после терапии ингибитором контрольной точки (фигура 11).

Заключения:

GEN1046 представляет собой первое в своей группе биспецифическое антитело PD-L1x4-1BB нового поколения, с приемлемым профилем безопасности и обнадеживающей ранней клинической активностью, в отличие от существующих агонистов 4-1BB.

В фазе повышения дозы этого исследования фазы I/IIa, для GEN1046 показан контролируемый профиль безопасности и предварительная клиническая активность в подвергнутой интенсивному предшествующему лечению популяции с солидными опухолями на поздних стадиях.

Большинство неблагоприятных событий были от слабых до умеренных; связанные с лечением увеличения уровня трансаминазы степени 3, разрешаемые с использованием кортикостероидов. Не наблюдали связанных с лечением увеличений уровня билирубина или увеличений уровня трансаминазы степени 4. Шесть пациентов имели ограничивающую дозу токсичность (DLT); максимально переносимая доза (MTD) не была достигнута.

Клиническое преимущество среди различных уровней дозы наблюдали у пациентов, включая пациентов, устойчивых к предшествующей иммунотерапии, и пациентов с опухолями, как правило, менее чувствительными к ингибиторам иммунных контрольных точек (ICI).

Контроль заболевания был достигнут у 65,6% пациентов, включая частичные ответы для трижды отрицательного рака молочной железы (1), рака яичника (1) и предварительно подвергнутого лечению ICI NSCLC (2).

Модуляцию фармакодинамических конечных точек наблюдали среди широкого диапазона уровней доз, демонстрируя биологическую активность.

Пример 13: Фармакокинетическая/фармакодинамическая модель

Разработана интегрированная полумеханистическая модель PK/PD (фармакокинетики/фармакодинамики), подразумевающая распределение GEN1046 в центральных и периферических PK компартментах, так же как распределение в опухолевых и лимфатических компартментах. Модель опирается на PK и фармакодинамические данные, так же как на физиологические параметры из литературы для параметризации экспрессии PD-L1 и 4-1BB, и миграции Т-клеток в эти ячейки. Модельные компартменты состоят из 2- и 3-мерных пространств с полным перемешиванием и свободным транспортом лекарственного средства между всеми компартментами. Кроме того, модель включает динамическое связывание GEN1046 с PD-L1 и 4-1BB для прогнозирования формирования тримера (перекрестного связывания с PD-L1 и 4-1BB) и занятости рецептора (RO) для PD-L1 и 4-1BB в опухоли. Моделирование показали, что формирование тримера является оптимальными при дозе 80 мг, и прогнозируемая по модели RO в опухоли для PD-L1 и 4-1BB казалась достаточной при дозах между 80 и 140 мг. Увеличивающиеся дозы ≥ 200 мг приводили к уменьшению формирования тримера. Кроме того, на основании доступных клинических фармакодинамических данных, более высокую амплитуду и согласованную модуляцию периферических фармакодинамических конечных точек (IFN γ и пролиферирующих Ki67+ эффекторных CD8+ Т-клеток памяти) наблюдали при уровнях дозы ≤ 200 мг. В свете прогнозов PK/фармакодинамического моделирования и доступных клинических данных,

прогнозировано, что оптимальная доза GEN1046 лежит в диапазоне от 80 до 140 мг. При дозе 100 мг 1Q3W, максимальное формирование тримеров и средняя RO для PD-L1 (%) сохранялись на целесообразных уровнях на протяжении всего интервала дозирования.

Прогнозированные согласно модели максимальное формирование тримеров и занятость рецептора для PDL1 при 100 мг 1Q3W показаны на фигуре 12.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения или предотвращения прогрессирования опухоли, или лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту, по меньшей мере в одном цикле лечения, связывающего средства в подходящем количестве, содержащего первую область связывания, связывающую CD137 человека, такой как CD137 человека, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека, такой как PD-L1 человека, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

2. Способ по п.1, в котором количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или цикле лечения, приводит к пролиферации, продукции цитокинов, созреванию и продленной выживаемости Т-клеток, и делает такие Т-клетки нечувствительными к ингибированию посредством PD-L1.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или цикле лечения, находится в диапазоне, в котором более чем 5%, предпочтительно более чем 10%, более предпочтительно более чем 15%, еще более предпочтительно более чем 20%, еще более предпочтительно более чем 25%, еще более предпочтительно более чем 30%, еще более предпочтительно более чем 35%, еще более предпочтительно более чем 40%, еще более предпочтительно более чем 45%, наиболее предпочтительно более чем 50% указанных связывающих средств связываются с обоими, CD137 и PD-L1.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

а) около 0,3-5 мг/кг массы тела или около 25-400 мг суммарно; и/или

б) около $2,1 \times 10^{-9}$ - $3,4 \times 10^{-8}$ моль/кг массы тела или около $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль суммарно.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором количество связывающего средства, введенное в каждой дозе и/или в каждом цикле лечения, составляет

а) около 1,25 мг/кг массы тела или около 100 мг суммарно; и/или

б) около $8,5 \times 10^{-9}$ моль/кг массы тела или около $6,8 \times 10^{-7}$ моль суммарно.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство активирует CD137 человека при связывании с ним, и ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека при связывании с PD-L1.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором

а) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 5;

и

б) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 12.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором

а) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 2, 3, и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 6, GAS, 7, соответственно;

и

b) вторая антигенсвязывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 9, 10, 11 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в: SEQ ID NO: 13, DDN, 14, соответственно.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5;

и

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99%, или 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором

a) первая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

и

b) вторая связывающая область содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство представляет собой антитело, мультиспецифическое антитело, такое как биспецифическое антитело.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство имеет формат полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

13. Способ по любому из пп. 7-12, в котором каждая переменная область содержит три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3) и четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4).

14. Способ по п.13, в котором указанные определяющие комплементарность области и указанные каркасные области аранжированы от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий

i) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной переменной области первой тяжелой цепи (VH) и константной области первой тяжелой цепи (CH), и

ii) полипептид, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из указанной переменной области второй тяжелой цепи (VH) и константной области второй тяжелой цепи (CH).

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий

- i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область первой легкой цепи (CL), и
- ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и дополнительно содержащий константную область второй легкой цепи (CL).

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство представляет собой антитело, содержащее первое связывающее плечо и второе связывающее плечо, в котором

первое связывающее плечо содержит

- i) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой тяжелой цепи (VH) и указанную константную область первой тяжелой цепи (CH), и
- ii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область первой легкой цепи (VL) и указанную константную область первой легкой цепи (CL);

и второе связывающее плечо содержит

- iii) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй тяжелой цепи (VH) и указанную константную область второй тяжелой цепи (CH), и
- iv) полипептид, содержащий указанную вариабельную область второй легкой цепи (VL) и указанную константную область второй легкой цепи (CL).

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий

- i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с CD137, и
- ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с PD-L1.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное связывающее средство содержит

- i) первую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с CD137, причем первая тяжелая цепь содержит константную область первой тяжелой цепи, и первая легкая цепь содержит константную область первой легкой цепи; и
- ii) вторую тяжелую цепь и легкую цепь, содержащие указанную антигенсвязывающую область, способную к связыванию с PD-L1, причем вторая тяжелая цепь содержит константную область второй тяжелой цепи, и вторая легкая цепь содержит константную область второй легкой цепи.

20. Способ по любому из пп. 15-19, в котором каждая из константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH) содержит одну или более из константной области 1 тяжелой цепи (CH1), шарнирной области, константной области 2 тяжелой цепи (CH2) и константной области 3 тяжелой цепи (CH3), предпочтительно по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и область CH3.

21. Способ по любому из пп. 15-20, в котором каждая из константных областей (CH) первой и второй тяжелой цепи содержит область CH3, и в котором две области CH3 содержат асимметричные мутации.

22. Способ по любому из пп. 15-21, в котором в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH) по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы,

состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, заменена, и в котором указанная первая и указанная вторая тяжелые цепи не имеют замен в одинаковых положениях.

23. Способ по п.22, в котором (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой L в указанной константной области первой тяжелой цепи (CH), и аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой R в указанной константной области второй тяжелой цепи (CH), или (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи.

24. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное связывающее средство индуцирует опосредованную Fc эффекторную функцию в меньшей степени, по сравнению с другим антителом, содержащим такие же первую и вторую антигенсвязывающие области и две константные области (CH) тяжелой цепи, содержащие шарнир, области CH2 и CH3 IgG1 человека.

25. Способ по п.24, в котором указанные константные области (CH) первой и второй тяжелой цепи являются модифицированными таким образом, что антитело индуцирует опосредованную Fc эффекторную функцию в меньшей степени, по сравнению с антителом, которое является идентичным, за исключением содержания немодифицированных константных областей (CH) первой и второй тяжелой цепи.

26. Способ по п.25, в котором каждая из указанных немодифицированных константных областей (CH) первой и второй тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15.

27. Способ по любому из пп.25-26, в котором указанную опосредованную Fc эффекторную функцию измеряют посредством связывания с рецепторами Fc γ , связывания с C1q или индукции опосредованного Fc перекрестного связывания рецепторов Fc γ .

28. Способ по п.27, в котором указанную опосредованную Fc эффекторную функцию измеряют посредством связывания с C1q.

29. Способ по любому из пп. 24-28, в котором указанные константные области первой и второй тяжелой цепи являются модифицированными таким образом, что связывание C1q с указанным антителом уменьшено, по сравнению с антителом дикого типа, предпочтительно, уменьшено по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100%, в котором связывание C1q предпочтительно, определяют посредством ELISA.

30. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере в одной из указанных константных областей первой и второй тяжелой цепи (CH), одна или более аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, не представляют собой L, L, D, N и P, соответственно.

31. Способ по п.30, в котором положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляют собой F и E, соответственно, в указанных первой и второй тяжелых цепях.

32. Способ по п.30 или 31, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, представляют собой F, E и A, соответственно, в указанных константных областях первой и второй тяжелой цепи (HC).

33. Способ по любому из пп. 30-32, в котором положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, из обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F и E, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой L.

34. Способ по любому из пп. 30-33, в котором положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, из обеих константных областей первой и второй тяжелой цепи представляют собой F, E и A, соответственно, и в котором (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области первой тяжелой цепи представляет собой L, и положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, константной области второй тяжелой цепи представляет собой R, или (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, первой тяжелой цепи представляет собой R, и положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, в соответствии с нумерацией EU, второй тяжелой цепи представляет собой L.

35. Способ по любому из пп. 15-34, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 30 [IgG1-FC],

b) подпоследовательности из последовательности в a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в a); и

c) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

36. Способ по любому из пп. 15-35, в котором константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 31 [IgG1-F405L],

b) подпоследовательности из последовательности в a), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в a); и

c) последовательности, имеющей, самое большее, 9 замен, например, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в a) или b).

37. Способ по любому из пп. 15-36, в котором константная область указанной первой или второй тяжелой цепи, например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 32 [IgG1-F409R]

b) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей самое большее 10 замен, например самое большее 9 замен, самое большее 8, самое большее 7, самое большее 6, самое большее 5, самое большее 4 замен, самое большее 3, самое большее 2 или самое большее 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

38. Способ по любому из пп. 15-37, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 33 [IgG1-Fc_FEA],

b) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей самое большее 7 замен, например самое большее 6 замен, самое большее 5, самое большее 4, самое большее 3, самое большее 2 или самое большее 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

39. Способ по любому из пп. 15-38, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, второй тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 34 [IgG1-Fc_FEAL],

b) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 6 замен, например, самое большее, 5 замен, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

40. Способ по любому из пп. 15-39, в котором константная область указанной первой и/или второй тяжелой цепи, например, первой тяжелой цепи, содержит или по существу состоит из, или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

a) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 35 [IgG1-Fc_FEAR]

b) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 6 замен, например, самое большее, 5 замен, самое большее, 4, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное связывающее средство содержит константную область легкой цепи каппа (κ).

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное связывающее средство содержит константную область легкой цепи лямбда (λ).

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ).

45. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная константная область первой легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи лямбда (λ).

46. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная константная область второй легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа (κ).

47. Способ по любому из пп. 41-46, в котором легкая цепь каппа (κ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21,

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

48. Способ по любому из пп. 42-47, в котором легкая цепь лямбда (λ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22,

б) подпоследовательности из последовательности в а), такой как подпоследовательность, в которой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 последовательных аминокислот делетирована/делетированы, начиная с N-конца или C-конца подпоследовательности, определенной в а); и

с) последовательности, имеющей, самое большее, 10 замен, например, самое большее, 9 замен, самое большее, 8, самое большее, 7, самое большее, 6, самое большее, 5, самое большее, 4 замен, самое большее, 3, самое большее, 2 или самое большее, 1 замену, по сравнению с аминокислотной последовательностью, определенной в а) или б).

49. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство принадлежит к изотипу, выбранному из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

50. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

51. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело принадлежит к аллотипу IgG1m(f).

52. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъект представляет собой субъекта-человека.

53. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой солидную опухоль.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почки, рака уротелия, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака мозга, глиомы, аденокарциномы, рака щитовидной железы, других видов рака кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкоза, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака яичника, рака эндометрия, рак предстательной железы, рака полового члена, рака шейки матки, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы из клеток Меркеля и мезотелиомы.

55. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака уротелия (рака мочевого пузыря, мочеточника, мочеиспускательного канала или почечной лоханки), рака эндометрия (EC), рака молочной железы (например, трижды отрицательного рака молочной железы (TNBC)), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN) (например, рака полости рта, глотки или гортани) и рака шейки матки.

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляют собой рак легкого.

57. Способ по п.56, в котором рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), такой как плоскоклеточный или неплоскоклеточный NSCLC.

58. Способ по п.57, в котором NSCLC не имеет сенсбилизирующей мутации эпидермального фактора роста (EGFR) и/или транслокации при анапластической лимфоме (ALK)/реаранжировки ROS1.

59. Способ по любому из пп. 56-58, в котором субъект был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиологии.

60. Способ по п.59, в котором субъекта подвергали химиотерапии на основе платины.

61. Способ по п.59, в котором субъект не является подходящим для терапии на основе платины и подвергнут альтернативной химиотерапии, например, лечению с использованием включающего гемцитабин режима.

62. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъекта подвергали предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

63. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

64. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

65. Способ по любому из пп.59-64, в котором субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиологии.

66. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором субъекта не подвергали предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

67. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой рак эндометрия.

68. Способ по п.67, в котором субъект имеет гистологию эпителия эндометрия, включающую: эндометриоидную, серозную, плоскоклеточную, светлоклеточную карциному или карциносаркому.

69. Способ по п.67 или 68, в котором субъект был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

70. Способ по любому из пп. 67-69, в котором субъект не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

71. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой рак уротелия, включая рак мочевого пузыря, мочеточника, мочеиспускательного канала или почечной лоханки.

72. Способ по п.71, в котором субъект был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против находящегося на поздних стадиях/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

73. Способ по п.71 или 72, в котором субъект был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

74. Способ по п.71 или 72, в котором субъекта подвергали химиотерапии на основе платины.

75. Способ по любому из пп. 71 или 72, в котором субъект не является подходящим для терапии на основе платины и был подвергнут альтернативной химиотерапии, например, лечению с использованием включающего гемцитабин режима.

76. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой рак молочной железы, такой как трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC).

77. Способ по п.76, в котором TNBC является отрицательным по HER2, например, как определено посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) или определения экспрессии белка посредством иммуногистохимии. Отрицательным по рецептору прогестерона, отрицательным по рецептору эстрогена...

78. Способ по п.76 или 77, в котором субъект подвергнут воздействию по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения против местнораспространенного/метастазирующего заболевания, например, по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения, включая режимы, включающие антрациклин, таксан, антиметаболит или ингибитор образования микротрубочек.

79. Способ по п.78, в котором субъект был подвергнут воздействию, самое большее, 4 предшествующих системных режимов лечения против местнораспространенного/метастазирующего заболевания, например, по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения, включая режимы, включающие антрациклин, таксан, антиметаболит или ингибитор образования микротрубочек.

80. Способ по любому из пп. 76-79, в котором субъект был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

81. Способ по п.80, в котором субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после указанного предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

82. Способ по любому из пп. 76-79, в котором субъект не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

83. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой рак головы и шеи, такой как плоскоклеточная карцинома головы и шеи (SCCHN).

84. Способ по п.83, в котором опухоль или рак представляет собой рецидивирующий или метастазирующий SCCHN.

85. Способ по п.83 или 84, в котором опухоль или рак представляет собой рак полости рта, глотки или гортани.

86. Способ по любому из пп. 83-85, в котором субъект был подвергнут воздействию вплоть до четырех предшествующих системных режимов лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

87. Способ по п.86, в котором субъекта подвергали химиотерапии на основе платины.

88. Способ по п.86, в котором субъект не являлся подходящим для терапии на основе платины и подвергнут альтернативной химиотерапии.

89. Способ по любому из пп. 83-88, в котором субъект был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

90. Способ по п.89, в котором субъект испытывал прогрессирование заболевания во время или после указанного предшествующего лечения с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

91. Способ по любому из пп. 83-88, в котором субъект не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

92. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опухоль или рак представляет собой рак шейки матки.

93. Способ по п.92, в котором рак шейки матки имеет плоскоклеточную, аденокарциномную или аденосквамозную гистологию.

94. Способ по п.92 или 93, в котором субъект был подвергнут воздействию по меньшей мере одного предшествующего системного режима лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания, такого как химиотерапия в комбинации с лечением, нацеленным на фактор А роста эндотелия сосудов, таким как лечение с использованием бевацизумаба, и испытывал прогрессирование заболевания во время или после последнего предшествующего системного лечения, такое как прогрессирование заболевания, определенное посредством радиографии.

95. Способ по п.94, в котором субъект был подвергнут воздействию, самое большее, 4 предшествующих системных режимов лечения против рецидивирующего/метастазирующего заболевания, включая химиотерапию в комбинации с лечением, нацеленным на фактор А роста эндотелия сосудов, таким как лечение с использованием бевацизумаба.

96. Способ по п.92 или 93, в котором субъект не был подвергнут предшествующему лечению с использованием ингибитора(ов) контрольной точки, такого как средство(а), нацеленное на PD-1/PD-L, такое как ингибитор PD-1/PD-L1.

97. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство вводят посредством системного введения.

98. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором связывающее средство вводят посредством внутривенной инъекции или инфузии.

99. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором каждый цикл лечения составляет три недели (21 сутки).

100. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором одну дозу вводят каждую третью неделю (1Q3W).

101. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором одну дозу вводят на сутки 1 каждого цикла лечения.

102. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором каждую дозу вводят посредством инфузии в течение минимум 30 минут, например, в течение минимум 60 минут, минимум 90 минут, минимум 120 минут или минимум 240 минут.

103. Композиция, содержащая связывающее средство, содержащее первую область связывания, связывающую CD137 человека, и вторую область связывания, связывающую PD-L1 человека, в которой количество связывающего средства в композиции составляет от 25 до 400 мг или $1,7 \times 10^{-7}$ - $2,7 \times 10^{-6}$ моль.

104. Композиция по п.103, содержащая около 80 мг указанного связывающего средства.

105. Композиция по любому из пп. 103-104, в которой связывающее средство является таким, как определено в любом из пп. 1-102.

106. Композиция по любому из пп. 103-105, в которой композиция предназначена для системного введения.

107. Композиция по любому из пп. 103-106, в которой композиция предназначена для инъекции или инфузии, такой как внутривенная инъекция или инфузия.

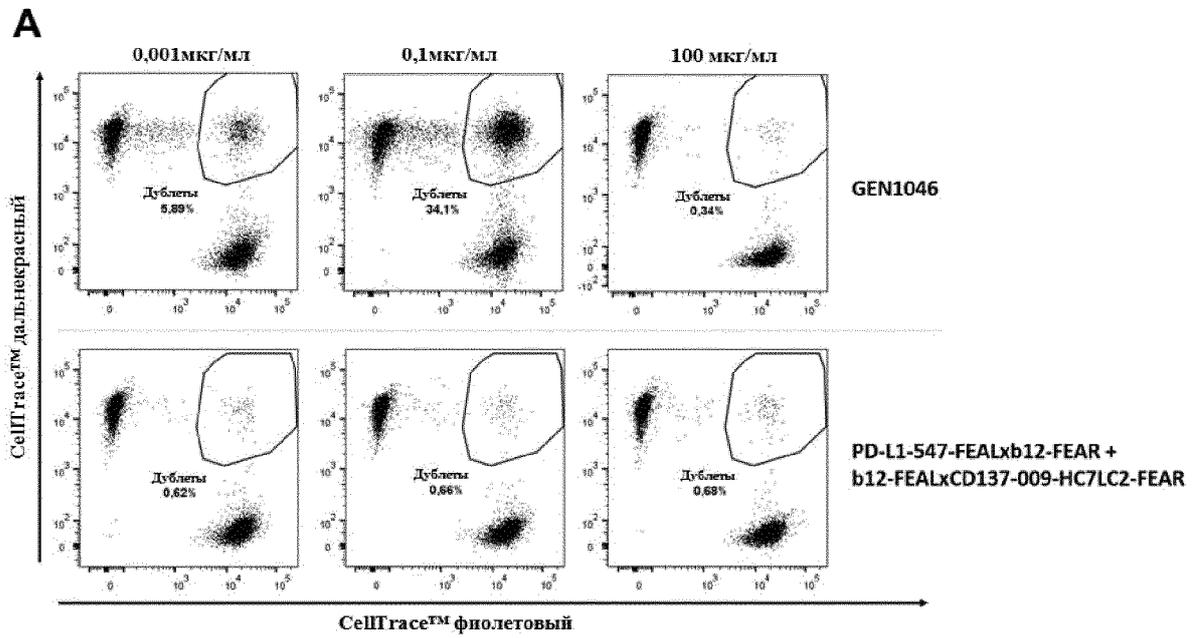
108. Композиция по любому из пп. 103-107, в которой связывающее средство находится в водном растворе, например, в 0,9% NaCl (солевом растворе), в объеме 50-500 мл, например, 100-250 мл.

109. Композиция по любому из пп. 103-108, в которой указанная композиция представляет собой единичную лекарственную форму

ФИГУРЫ

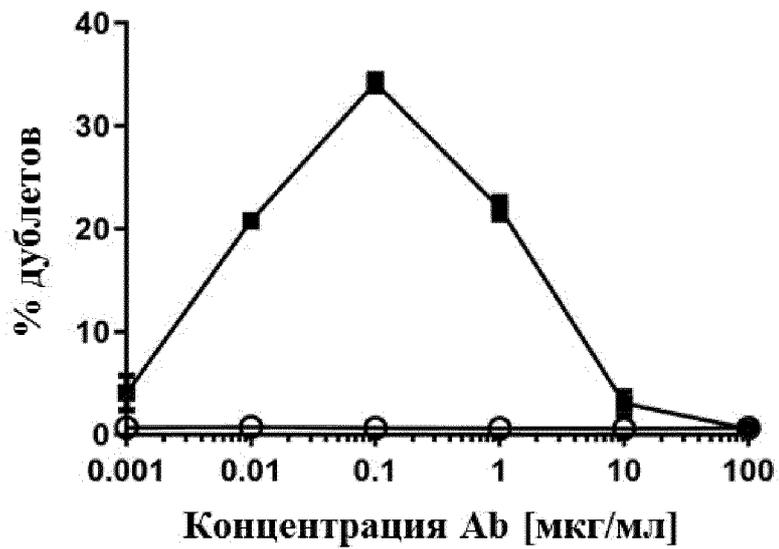
1/14

Фигура 1



B

K562_h4-1BB + K562_hPD-L1

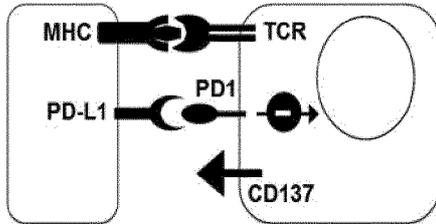


- GEN1046
- PD-L1-547-FEALxb12-FEAR + b12-FEALxCD137-009-HC7LC2-FEAR

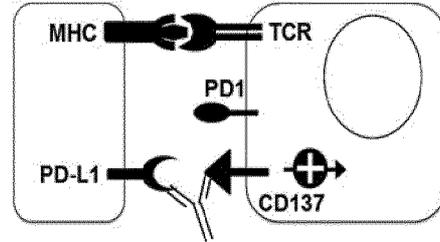
Фигура 2

А. Опосредованное PD1 ингибирование Т-клеткиАПС или
клетка опухоли

Т-клетка

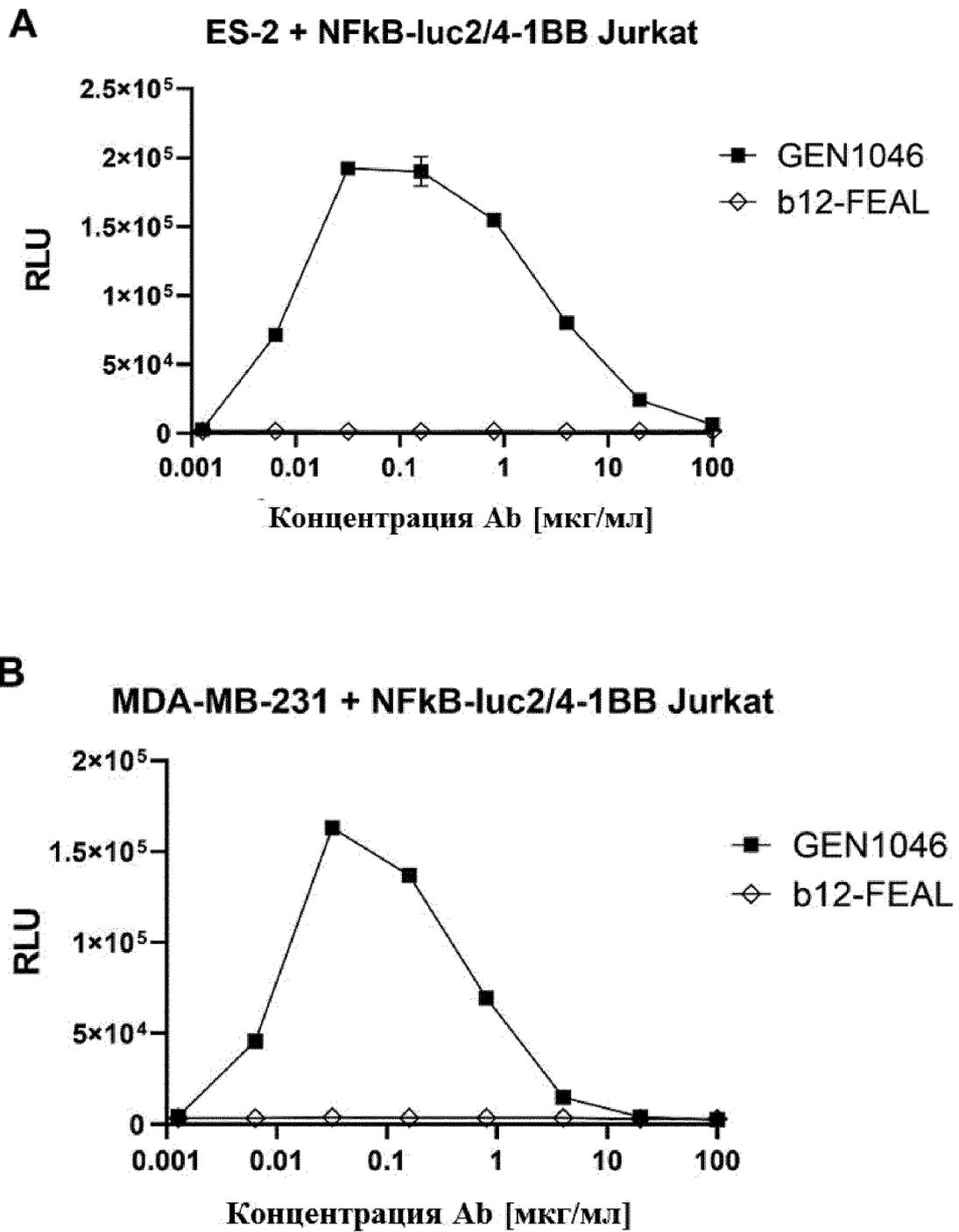
В. Блокирование PD-L1 + костимуляция Т-клеткиАПС или
клетка опухоли

Т-клетка

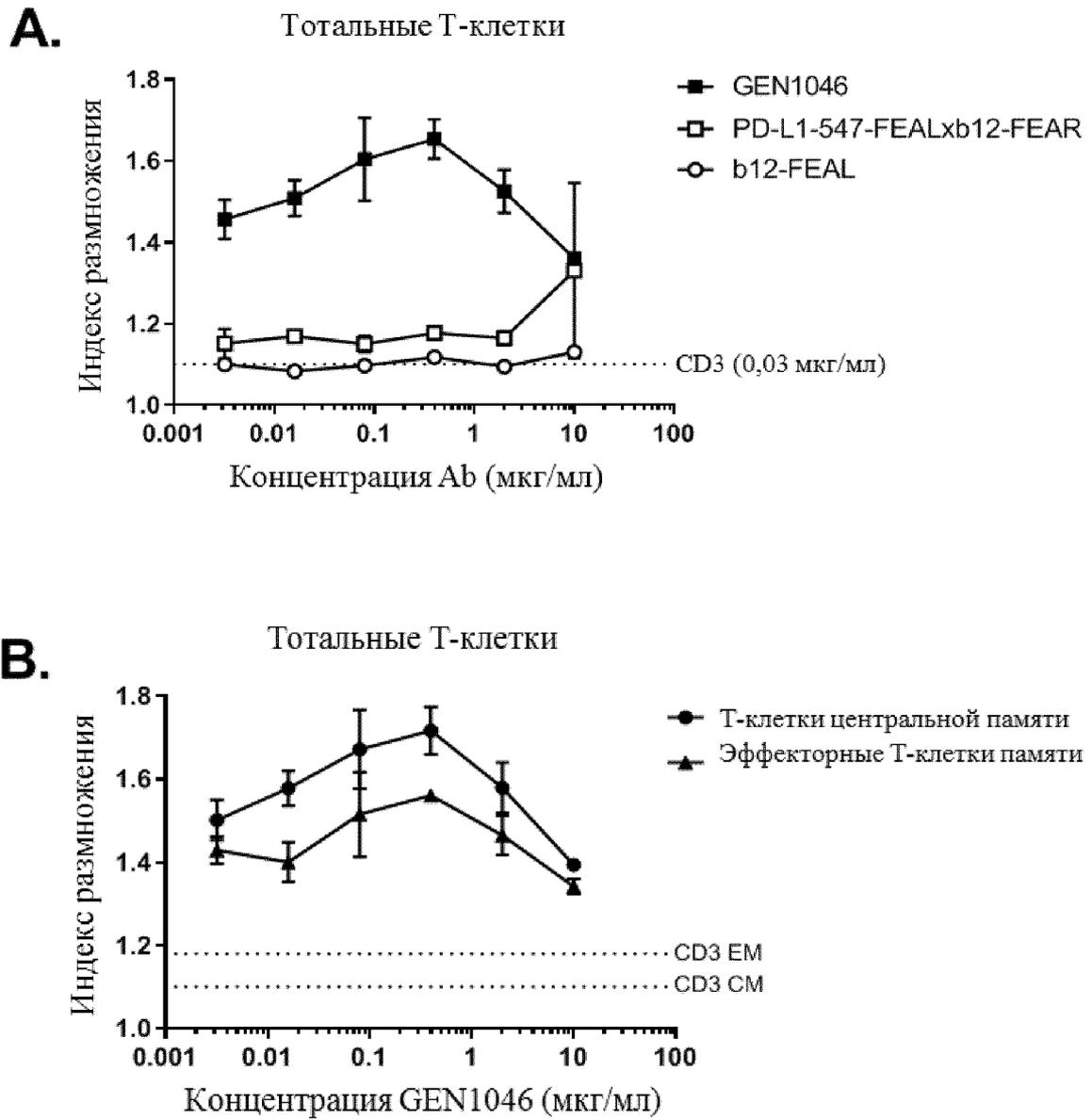


биспецифическое антитело CD137xPD-L1

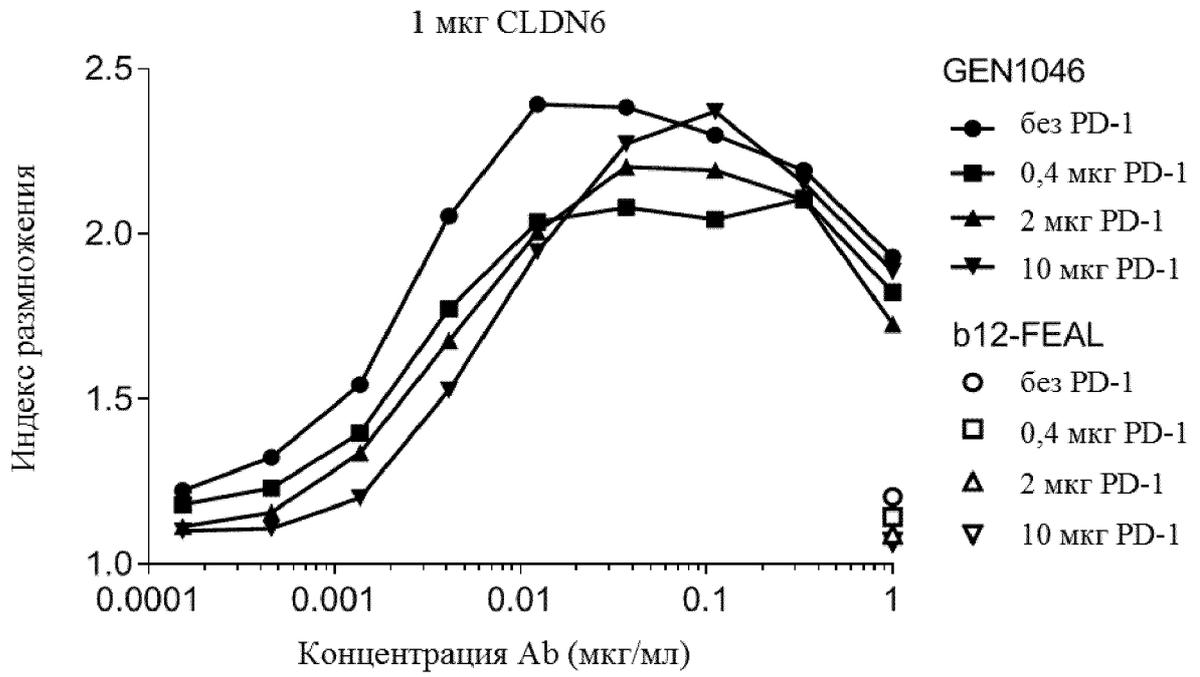
Фигура 3



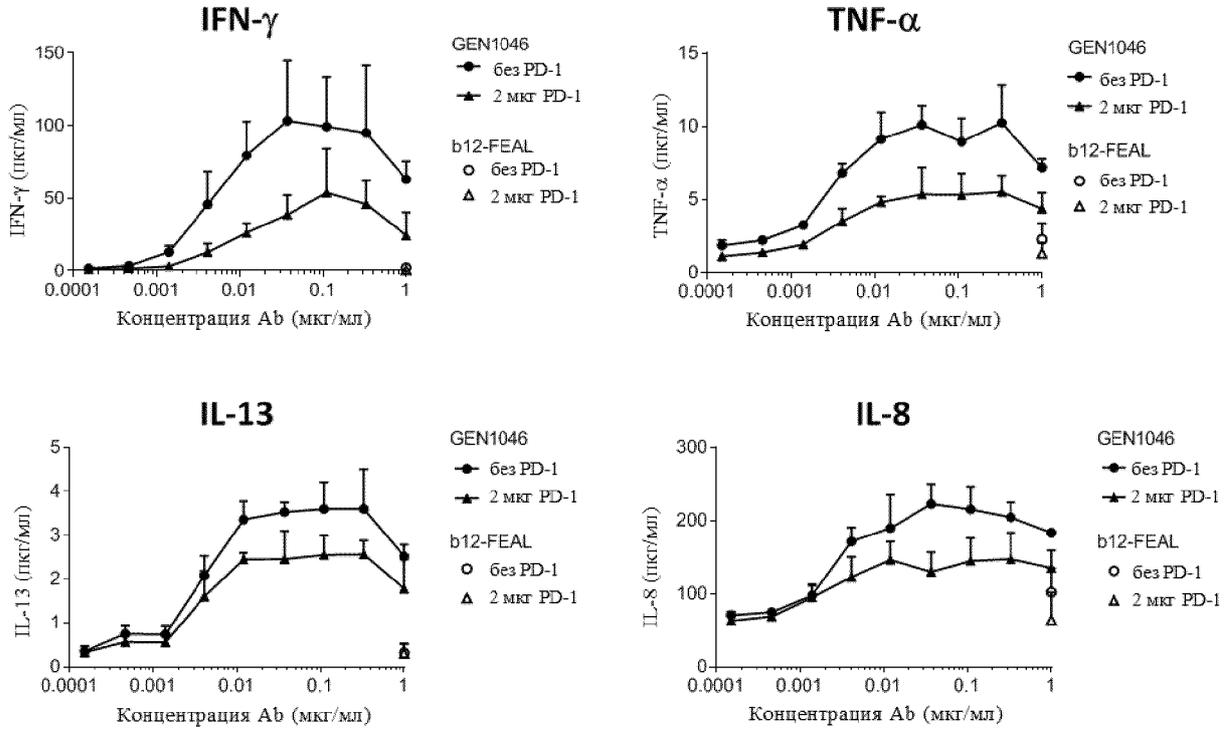
Фигура 4



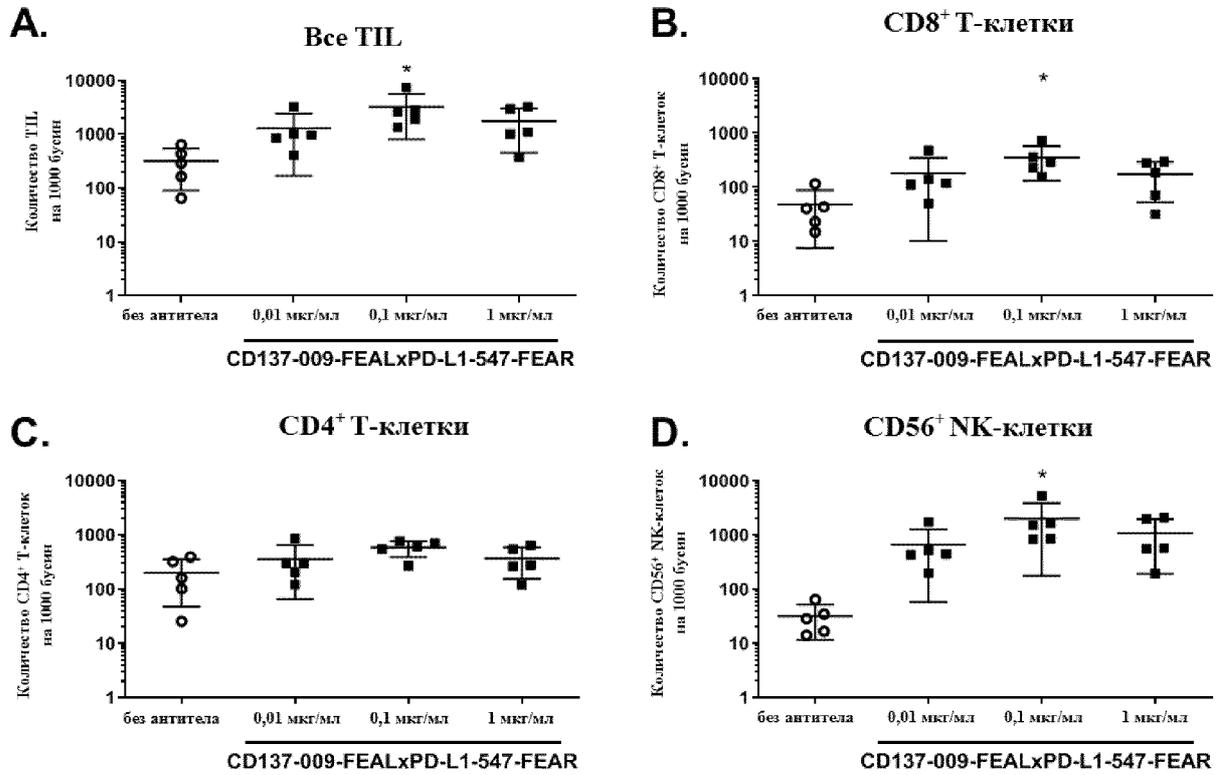
Фигура 5



Фигура 6



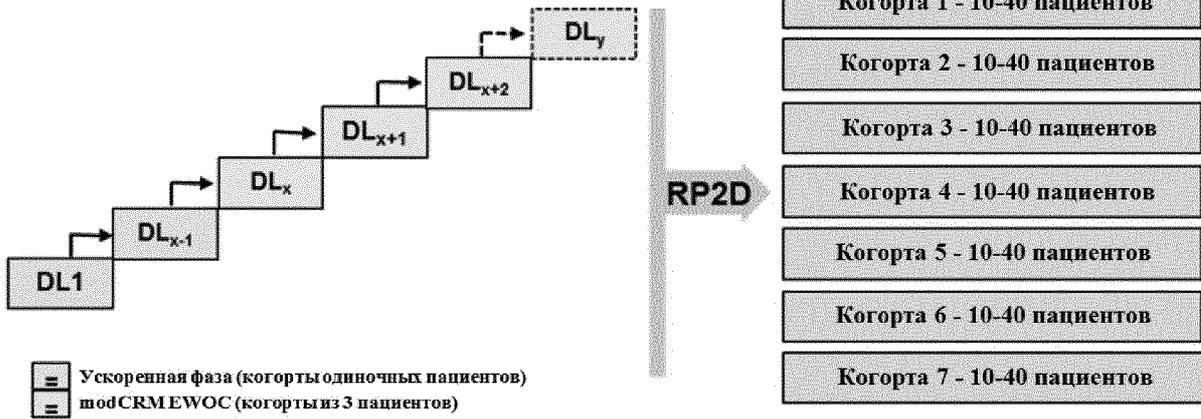
Фигура 7



Фигура 8

Часть повышения дозы

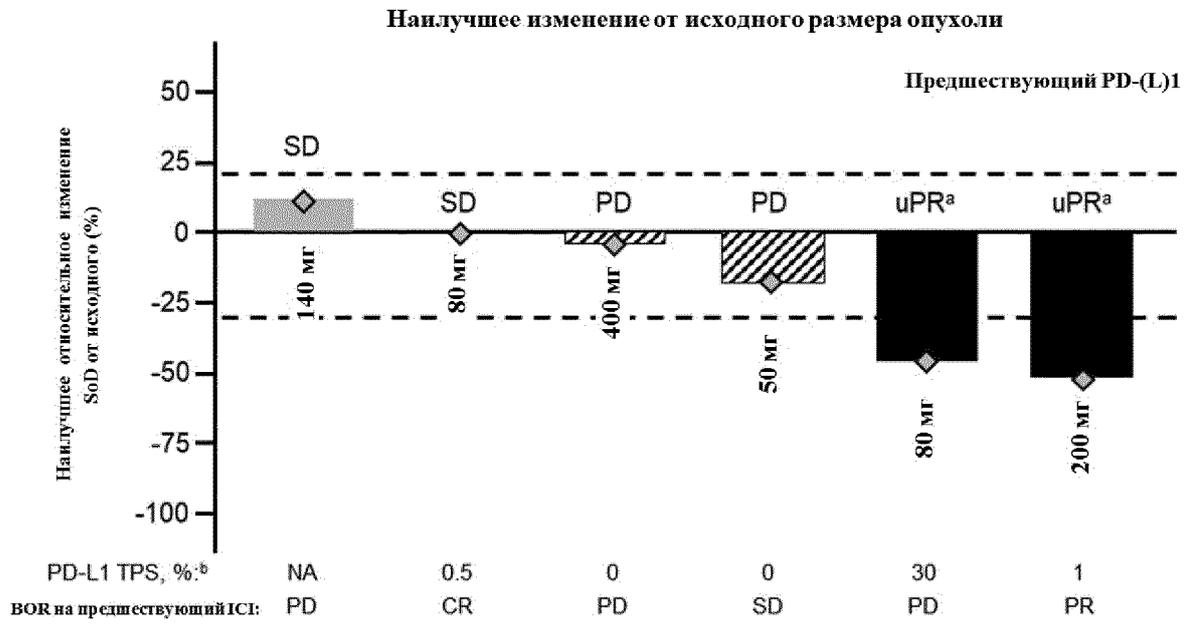
Часть расширения



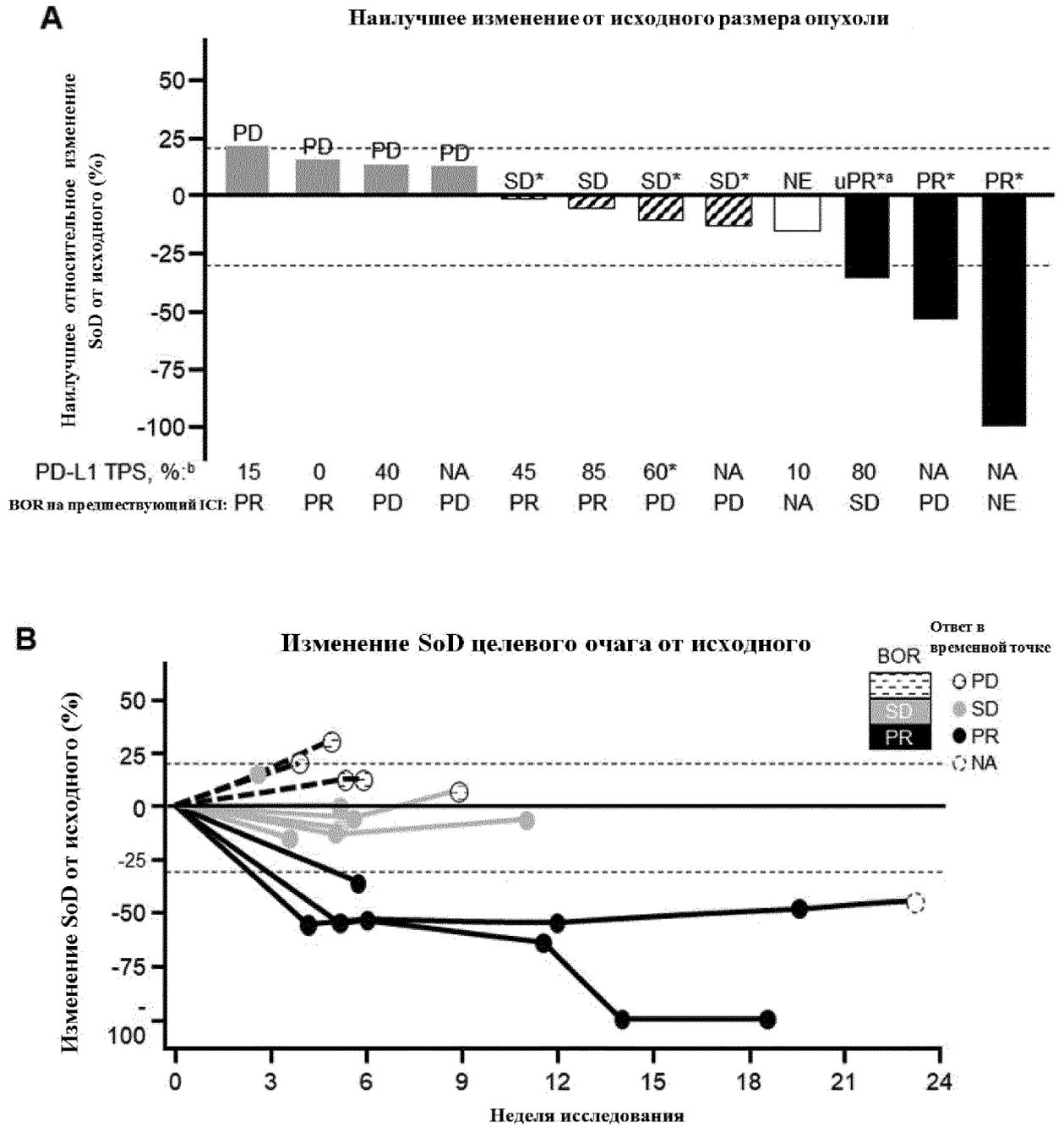
DL_x: Уровень дозы, при котором проводят переключение когорты от одиночных до 3 пациентов

DL_y: наивысший исследуемый уровень дозы

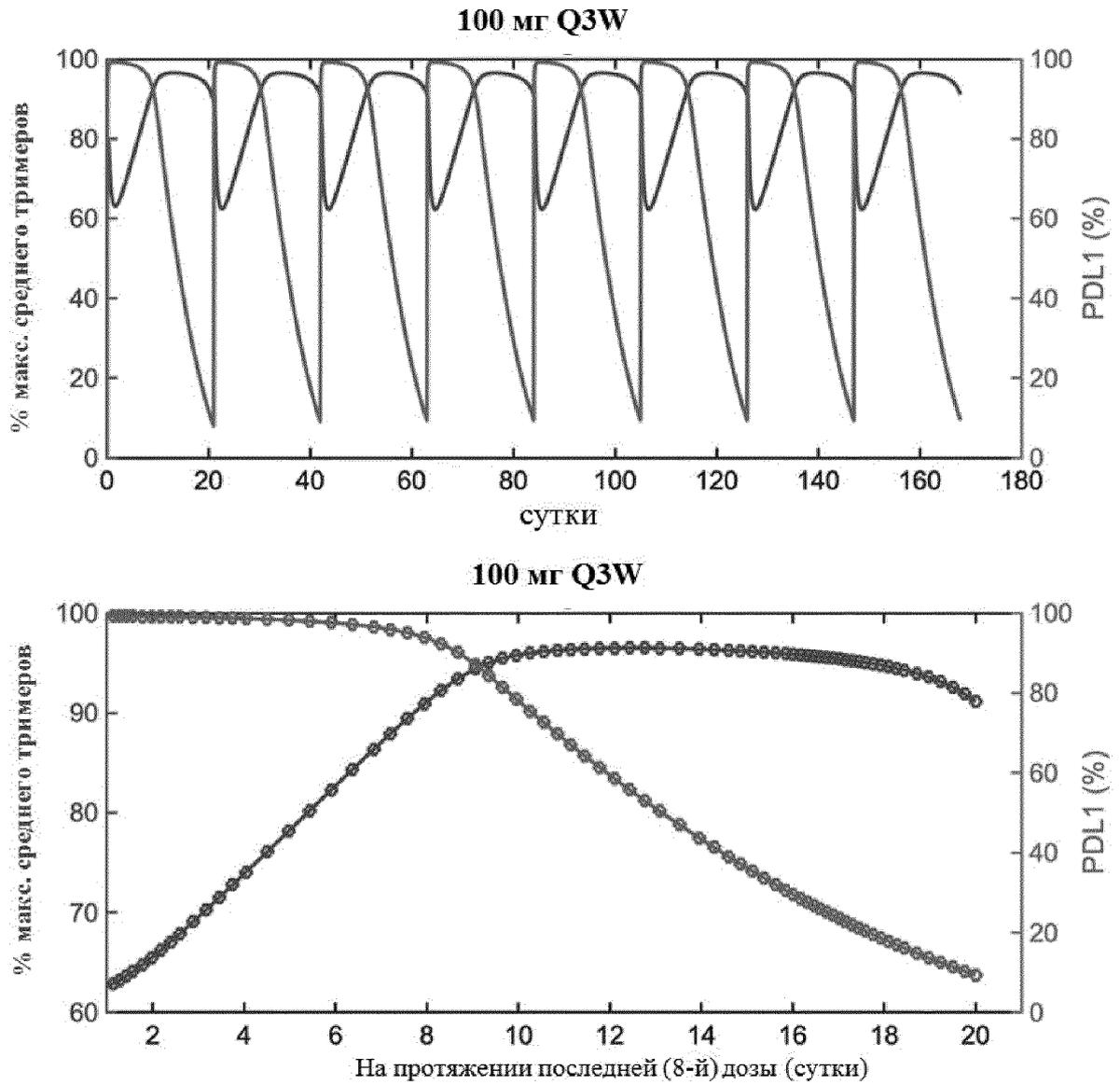
Фигура 10



Фигура 11



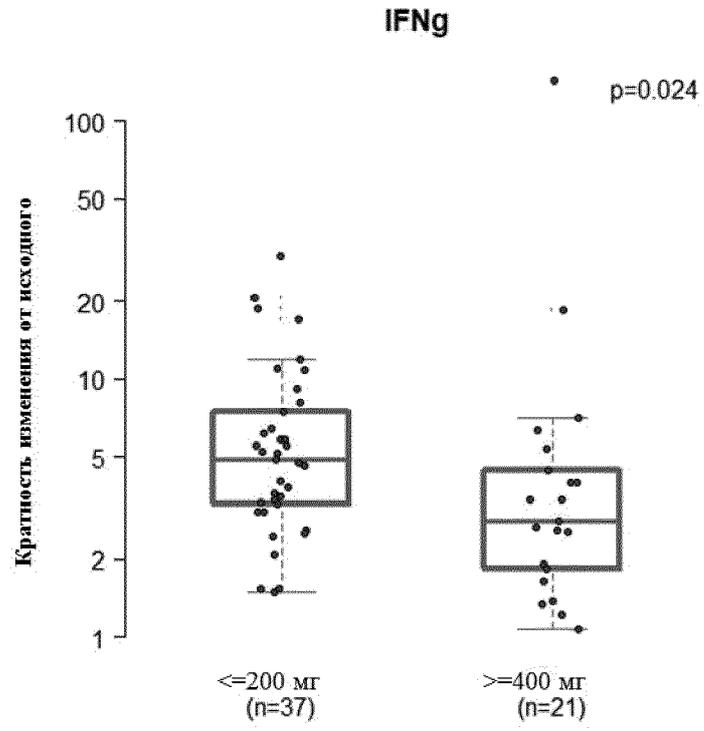
Фигура 12



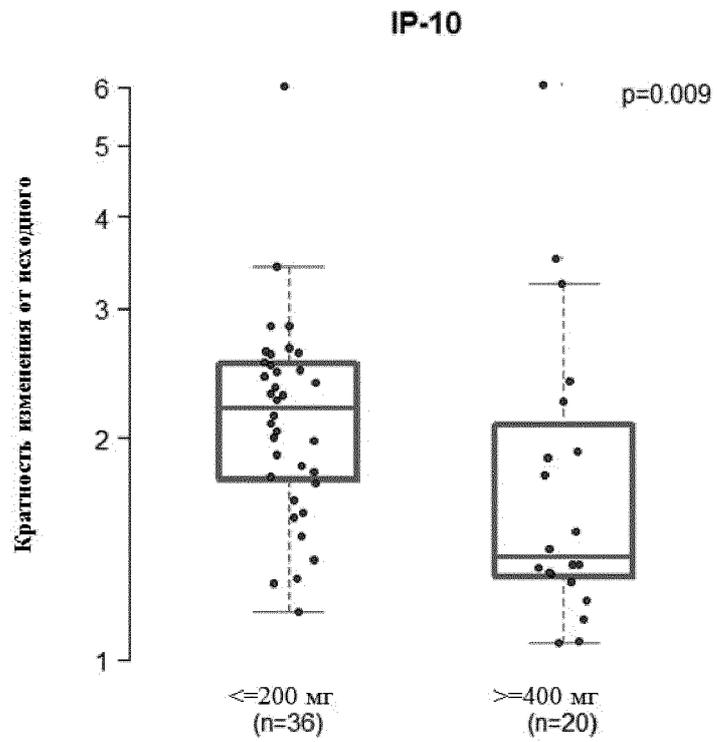
13/14

Фигура 13

А

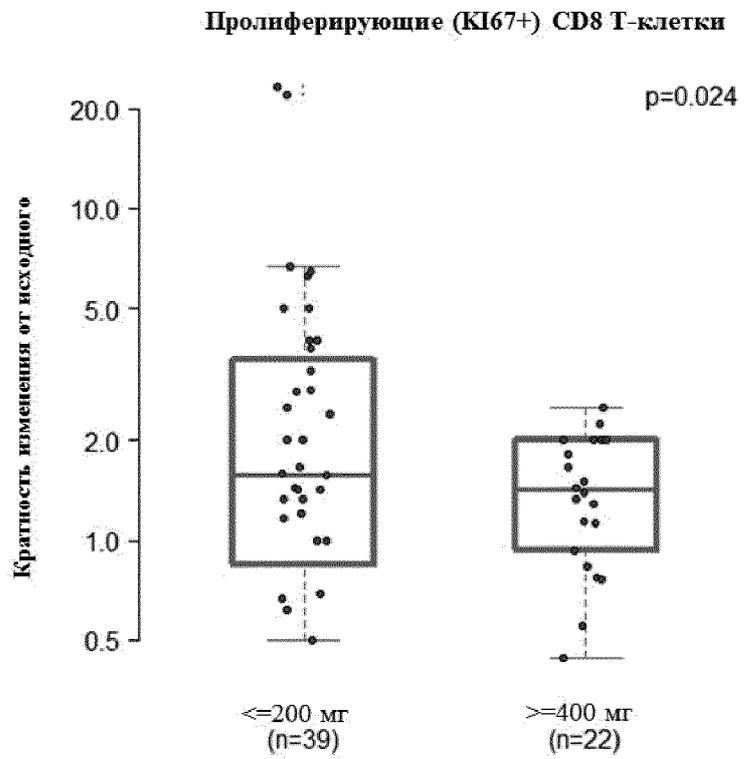


В



Фигура 13

С



D

